

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته دامپزشکی- بهداشت مواد غذایی

موضوع:

بررسی میزان شیوع گونه های آفلاتوکسین زای اسپرژیلوس و باقیمانده
آفلاتوکسین به روش الایزا در خوراک ماهیان سردآبی پرورشی
(قزل آلا ی رنگین کمان) در استان های تهران و آذربایجان غربی

استاد راهنما:

دکتر ودود رضویلر

استاد مشاور:

دکتر عباسعلی مطلبی

نگارنده:

کیوان ابراهیمی محمدی

سال تحصیلی : ۱۳۸۸-۱۳۸۷

با سپاس فراوان :

از استاد بزرگوارم، جناب آقای **دکتر ودود رضویلر** (استاد گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران) که با وجود مشغله فراوان، زحمت راهنمایی این رساله را متقبل شدند و در طول تحصیل و تحقیقاتم همیشه یاور و راهنمای اینجانب بوده اند.

از استاد عزیزم، جناب آقای **دکتر عباسعلی مطلبی** (دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران) که در مسیر تحقیقاتم، مشاور مشفق و دلسوز اینجانب بوده و متحمل زحمت فراوان شدند،

از الطاف اعضای محترم کمیته نظارت بر تحقیق این رساله، جناب آقای **دکتر ایرج سهرابی حدوست** (ریاست محترم دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی)، سرکار خانم **دکتر مهزاد آقازاده مشکی** (استادیار گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران) و آقای **دکتر عیسی شریف پور** که مجدانه پیگیر امورات این پژوهش بوده اند،

و از استاد ارجمندم سرکار خانم **دکتر گیتی کریم** (استاد گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران)، جناب آقای **دکتر علیرضا خسروی** (استاد گروه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) و سرکار خانم **دکتر شهلا رودبار محمدی** (استادیار گروه قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس) و که بر بنده منت نهاده و زحمت دآوری این رساله را عهده دار شده اند.

همچنین از همیاری دوست و همکار عزیزم، جناب آقای **دکتر امیر تکمه چی** (استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه) در طول دوره تحقیقاتم، صمیمانه سپاسگزارم.

و تقدیم به :

روح بلند پدرم که همواره در یاد و خاطرم زنده است و راه چگونه بودن به من آموخت،
و تقدیم به تمامی عزیزانم که دوستشان دارم:

مادرم، این بزرگ اسوهٔ مهربانی و فداکاری که همیشه مایهٔ سربلندی و افتخارم است ،
همسرم، آرامش خاطرم که دلتنگی ام را با صبر به شادی بدل کرد،
دخترم ، پارهٔ تنم که وجودش مایهٔ رحمت و برکت زندگی و امید و آرزوهایم است.

و تقدیم به :

دوستان و عزیزانی که در طول تحصیل در کنارشان بسیار فیض بردم و هرگز فراموششان نخواهم
کرد.

۱	چکیده (فارسی).....	
۲	مقدمه.....	
۹	فصل اول- کلیات	
۱۰	بخش اول	
۱۰	مایکوتوکسین ها.....	۱-۱-
۱۰	۱-۱-۱- تعریف و خواص عمومی.....	
۱۰	۱-۱-۲- قارچ های تولید کننده توکسین.....	
۱۱	۱-۱-۳- شرایط تولید مایکوتوکسین ها (جنبه های عمومی).....	
۱۲	۱-۱-۴- شرایط تولید مایکوتوکسین ها (جنبه های اختصاصی).....	
۱۲	- آفاتوکسین ها (تعریف, انواع و شرایط تولید).....	
۱۵	۱-۱-۵- قارچ های تولید کننده آفاتوکسین (ویژگی ها و روش های کشت و جداسازی).....	
۱۵	۱-۱-۵-۱- جنس پنی سلیم.....	
۱۷	۱-۱-۵-۲- جنس اسپرژیلوس.....	
۱۷	۱-۱-۵-۲-۱- خصوصیات عمومی.....	
۱۹	۱-۱-۵-۲-۲- شناسایی.....	
۲۱	۱-۱-۵-۲-۳- اسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازایتیکوس.....	
۲۵	بخش دوم	
۲۵	نقش مایکوتوکسین ها در بیماری های انسان و دام.....	۱-۲-
۲۵	۱-۲-۱- جنبه های عمومی.....	
۲۷	۱-۲-۲- جنبه های اختصاصی.....	
۲۷	۱-۲-۲-۱- مایکوتوکسیکوز حاد اولیه.....	
۲۸	۱-۲-۲-۲- مایکوتوکسیکوز مزمن اولیه.....	
۲۹	۱-۲-۲-۳- آفاتوکسیکوزیس و اثرات بیولوژیک آفاتوکسین ها در دام ها.....	
۳۱	۱-۲-۲-۴- تشخیص آفاتوکسیکوزیس در دام.....	
۳۱	۱-۲-۲-۴-۱- نشانه های بالینی.....	
۳۱	۱-۲-۲-۴-۲- روش های آزمایشگاهی تشخیص آفاتوکسیکوزیس در دام.....	
۳۲	۱-۲-۲-۴-۳- اپیدمیولوژی.....	
۳۳	۱-۲-۲-۴-۴- یافته های کالبدگشایی.....	
۳۳	۱-۲-۲-۴-۵- تشخیص تفریقی.....	
۳۳	۱-۲-۲-۴-۶- مسمومیت همزمان با سایر سموم قارچی.....	
۳۳	۱-۲-۲-۴-۷- کنترل و پیشگیری.....	
۳۴	۱-۲-۲-۴-۸- درمان.....	
۳۴	۱-۲-۲-۵- آفاتوکسیکوزیس و آفاتوکسین ها در ماهیان.....	
۳۴	۱-۲-۲-۵-۱- حضور آفاتوکسین ها در خوراک ماهیان و اپیدمیولوژی ۰۰۰.....	
۳۶	۱-۲-۲-۵-۲- علایم آفاتوکسیکوزیس در ماهیان.....	
۳۸	۱-۲-۲-۵-۳- نظارت و کنترل آفاتوکسین ها در آبزیان پرورشی.....	
۳۹	۱-۲-۲-۶- آفاتوکسین ها و سلامتی انسان.....	
۴۱	بخش سوم	
۴۱	۱-۳-۱- راه های جلوگیری از آلودگی محصولات غذایی با سموم قارچی.....	
۴۱	۱-۳-۱- مقدمه.....	

۴۴	۲-۳-۱- روش های مدیریتی و متدهای غیر فعال سازی آفاتوکسین ها در ۰۰۰
۴۵	۱-۲-۳-۱- روش های مدیریتی جلوگیری از حضور آفاتوکسین
۴۵	۱-۱-۲-۳-۱- مدیریت پیش از برداشت
۴۶	۲-۱-۲-۳-۱- مدیریت برداشت
۴۶	۳-۱-۲-۳-۱- مدیریت بعد از برداشت
۴۶	۲-۲-۳-۱- متدهای غیر فعال سازی آفاتوکسین ها
۴۷	۱-۲-۲-۳-۱- روش های شیمیایی
۵۰	۲-۲-۲-۳-۱- روش های بیولوژیکی
۵۰	۳-۲-۲-۳-۱- روش های فیزیکی
۵۶	بخش چهارم
۵۶	۴-۱- روش های تشخیص و جداسازی آفاتوکسین ها در مواد غذایی
۵۶	۱-۴-۱- روش های فیزیکی و شیمیایی
۵۶	۱-۱-۴-۱- نمونه برداری
۵۷	۲-۱-۴-۱- استخراج
۵۷	۳-۱-۴-۱- خالص سازی
۵۸	۴-۱-۴-۱- اندازه گیری
۵۸	۲-۴-۱- روش های زیستی و بیولوژیکی
۶۰	۳-۴-۱- سایر روش های جداسازی
۶۱	فصل دوم- روش کار و کارهای انجام شده
۶۲	۱-۲- آشنایی با ویژگی های جغرافیایی و وضعیت پرورش ماهی قزل آلا در ۰۰۰
۶۴	۲-۲- روش تحقیق
۶۴	۱-۲-۲- نوع روش تحقیق
۶۴	۲-۲-۲- جامعه آماری
۶۶	۳-۲-۲- واحد نمونه گیری
۶۶	۴-۲-۲- روش نمونه گیری
۶۶	۵-۲-۲- حجم نمونه
۶۸	۳-۲- روش کار
۶۸	۱-۳-۲- تعیین میزان شیوع اسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازیتیکوس در ۰۰۰
۶۸	۱-۱-۳-۲- نمونه گیری
۶۹	۲-۱-۳-۲- آماده سازی و کشت و شمارش
۷۱	۲-۳-۲- اندازه گیری باقیمانده آفاتوکسین توتال در خوراک ماهیان سردابی
۷۱	۱-۲-۳-۲- نمونه گیری
۷۲	۲-۲-۳-۲- آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری آفاتوکسین توتال ۰۰۰
۷۴	فصل سوم - نتایج آزمایشات و تجزیه و تحلیل آماری یافته ها
۷۵	۱-۳- نتایج
۷۵	۱-۱-۳- نتایج مربوط به بررسی میزان شیوع سویه های آفاتوکسین زای ۰۰۰
۷۷	۲-۱-۳- نتایج مربوط به اندازه گیری آفاتوکسین به روش الیزا در ۰۰۰
۸۰	۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری داده ها
۸۰	۱-۲-۳- تحلیل توصیفی داده ها
۹۸	۲-۲-۳- تحلیل استنباطی داده ها
۱۰۳	فصل چهارم- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۱۱۷ منابع فارسی
۱۱۹ منابع انگلیسی
۱۲۴ چکیده انگلیسی

چکیده :

آفاتوکسین ها یکی از انواع سموم قارچی تولیدشده توسط گونه های توکسیژنیک اسپرژیلوس (آ. فلاووس و آ. پارازائیتیکوس) و به عبارتی متابولیت های ثانویه آن ها هستند که به عنوان یکی از عوامل تهدیدکننده سلامت مصرف کنندگان مواد غذایی، مطرح می باشند. در تحقیق حاضر تعداد ۹۶ نمونه خوراک ماهیان سردآبی پرورشی (قزل آلا ی رنگین کمان) به روش تصادفی (Random) ساده و قشری، در طی دو فصل بهار و تابستان (پانزدهم هر ماه) سال ۱۳۸۶ با اهداف: الف- تعیین میزان شیوع گونه های آفاتوکسین ساز اسپرژیلوس در خوراک انبار شده مصرفی ماهیان سردآبی پرورشی در استخرهای پرورشی استان آذربایجان غربی بر حسب فصول (بهار و تابستان)، ب- تعیین میزان باقیمانده آفاتوکسین توتال در خوراک انبارشده مصرفی ماهیان در استخرهای پرورشی استان آذربایجان غربی بر حسب فصول (بهار و تابستان) به روش الیزا و بر حسب ppb و ج- تعیین باقیمانده این سم در خوراک تولیدی ماهیان در کارخانجات تولیدی خوراک آبزیان استان های تهران و آذربایجان غربی بر حسب فصول و به روش فوق الذکر، جمع آوری شدند.

به منظور بررسی میزان شیوع گونه های اسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازائیتیکوس، از روش کشت پورپلیت بر محیط های عمومی مالت اکستراکت آگار و سابوردکستروز آگار و براساس استاندارد ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران، استفاده شد و کلنی های ایجاد شده، مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. جهت تعیین میزان باقیمانده آفاتوکسین از روش الیزا و با بهره گیری از کیت «اگراکوانت» شرکت «Romer lab» استفاده شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که فقط ۸/۳ % نمونه ها به قارچ اسپرژیلوس فلاووس آلوده بوده و آ. پارازائیتیکوس عملاً جداسازی و مشاهده نگردید. بررسی ها نشان داد که میزان شیوع آ. فلاووس با فصل و ماه های نمونه برداری در سطح کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) رابطه معنی داری ندارد و وجود و عدم وجود آن به تفکیک فصل و ماه یکسان می باشد.

بررسی میانگین مقادیر آفاتوکسین، نشان داد که مقادیر این عامل همگی پایین تر از سطوح تولرانس (تحمل) تعیین شده توسط کمیته مشترک WHO و FAO می باشند (میانگین آن در تمامی یافته ها کمتر از ۱۱ ppb بود). از طرفی میانگین میزان باقیمانده آفاتوکسین توتال در فصول بهار و تابستان در خوراک انباری مراکز مختلف پرورشی ماهیان سردآبی استان آذربایجان غربی و کارخانجات استان تهران، یکسان بوده و تفاوت معنی داری مشاهده نشد. ($P < 0.05$). ولی بین میزان باقیمانده آفاتوکسین توتال کارخانه تولیدی استان آذربایجان غربی در فصول بهار و تابستان در سطح کمتر از ۰/۰۵ تفاوت معنی داری وجود دارد و میزان آن در بهار (۸/۶ ppb) بیشتر از تابستان (۶/۱ ppb) است.

از طرفی میزان شیوع آفاتوکسین در کارخانجات تهران (۹/۲ ppb) بیشتر از آذربایجان غربی (۷/۴ ppb) می باشد. به عبارتی مکان به عنوان عامل تأثیر گذار در میزان آفاتوکسین توتال نمونه ها بود.

همچنین بررسی ها نشان داد که در سطح کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) میان میزان آفاتوکسین توتال به تفکیک مزارع تفاوت معنی داری وجود دارد و میانگین میزان عامل در مزارع سدخاکی (۶/۷۵ ppb) و دومنظوره (۶/۲۵ ppb) بیشتر از استخرهای منفرد (۴/۶۷ ppb) می باشد.

نتایج کلی این آزمون بر حضور بسیار پایین غیرتأثیرگذار اسپرژیلوس فلاووس بر حضور مقادیر آفاتوکسین توتال در خوراک ماهیان تأکید داشته و با توجه به پایین بودن مقادیر آفاتوکسین کمتر از ۲۰ ppb، بر سلامت خوراک تولیدی ماهیان سردآبی (قزل آلا ی رنگین کمان) در استان های تهران و آذربایجان غربی (در بهار و تابستان ۱۳۸۶) دلالت می کند.

مقدمه :

افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی به ویژه پروتئین با کیفیت بالا، سبب گردیده تا در چند دهه اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی و آبزیان مبذول گردیده، مطالعات بیشتری در زمینه انواع آبزیان انجام گیرد. برابر آمارهای منتشره میزان صید جهانی آبزیان از ۲۰ میلیون تن در سالهای بعد از جنگ جهانی دوم، به ۱۱۰ میلیون تن در اوایل قرن جدید میلادی رسید و در حال حاضر حدود ۱۶۵ میلیون تن رسیده است که ۴۰٪ آن از طریق آبی پروری و منابع غیر دریایی بوده است. در این بین وجود نیازهای تغذیه ای به خصوص در کشورهای در حال توسعه و امکان تأمین بخشی از آن از طریق منابع دریایی و بخشی از طریق آبی پروری، ضرورت شناخت، توجه و بهره گیری از این منابع را به خوبی نشان می دهد. کشور ایران هم در حال حاضر میزان تولید این بخش از مواد غذایی را به حدود ۶۰۰ هزار تن در سال رسانیده است که حدود ۳۰٪ آن از طریق پرورش آبزیان و ۷۰٪ از طریق صید حاصل آمده است. در این بین استان آذربایجان غربی با مساحتی بالغ بر ۴۳۶۶۰ کیلومتر مربع، در شمال غربی ایران واقع شده و جزو مناطق استپی سردسیر است که میزان بارندگی این استان ۳۰۰ الی ۴۰۰ میلی متر در سال و حداکثر آن در طول فصول پاییز و زمستان است. حدود ۱۳۰۰ چشمه دایمی و فصلی و ۴۴۰۰۰ حلقه چاه های عمیق، نیمه عمیق و آرتزین، ۱۳ دریاچه پشت سد و ۳۴ رودخانه دایمی و فصلی در این استان موجود است. (سیمای شیلات استان آ.غ.، ۱۳۸۳) بدین سان در این استان به لحاظ شرایط خاص جغرافیایی و اقلیمی، پتانسیل های مستعد بسیاری در زمینه تکثیر و پرورش انواع ماهیان دارد. به گونه ای که در حال حاضر میزان تولید سالانه این استان در خصوص انواع آبزیان پرورشی به ۳۸۶۰ تن در سال رسیده است. در بین ماهیان پرورشی، ماهیان سردابی به ویژه قزل آلا *Rainbow Trout* و نام علمی *Onchorhynchus mykiss* وجود دارد که در حال حاضر در سبد غذایی افراد جامعه جایگاه ویژه ای پیدا کرده است. این امر استان را به قطب مهم شیلات کشور تبدیل کرده است. چنانچه فعالیت سردابی بسیار متنوع بوده و شامل استخرهای سردابی منفرد (۲۳ استخر)، استخرهای دو منظوره کشاورزی و استخرهای ذخیره آب کشاورزی (۱۰۳ مزرعه) و پرورش در استخرهای خاکی (۱۱ استخر) می باشد و احداث مجتمع های سردابی با تولید بسیار بالا در حال اجرا و راه اندازی است. (پرورش در قفس (۱۰ مورد) در حال اجراست). در حال حاضر تولید ماهی قزل آلا در این استان به رقم ۱۷۰۰ تن رسیده است و به دیگر استان های کشور هم صادر می شود. (سیمای شیلات استان آ.غ.، ۱۳۸۳) همین امر زمینه را برای فعالیت در مورد تولید مکانیزه و در تناژ بالای خوراک آبزیان در جای جای کشور فراهم نموده است. به گونه ای که امروزه در نقاط مختلف کشور و از جمله در استان های تهران (به عنوان استان برتر در زمینه تولید خوراک آبزیان) و آذربایجان غربی، شرکت های بزرگ و کارخانجات متعدد تولید خوراک آبزیان مشغول به فعالیت بوده و جیره غذایی ماهیان پرورشی را در مراحل مختلف رشد، تولید و به بازار عرضه می کنند. همین گستردگی و پیشرفت روزافزون، توجه و دقت فراوان در شرایط تولید و عرضه این مواد غذایی را طلب می کند.

از طرفی با وجود افزایش تعداد مزارع پرورشی، متأسفانه به دلیل عدم مدیریت مناسب در بعضی از مزارع، گاه شاهد تلفات وسیع، کاهش رشد ماهیان و ضررهای جبران ناپذیر هستیم. چنانچه به ویژه در چند سال گذشته بنا بر اسناد و گزارشات اداره شیلات استان (طی مراجعه به اداره مذکور و هماهنگی با مسئولین مربوط) هر ساله بین ۳ تا ۴ مزرعه دچار تلفات شده اند که اکثریت آن ها بنا بر گزارشات بر اثر مسمومیت های غذایی بوده است. البته مطالعات کافی در این زمینه صورت نگرفته و نیاز به بررسی بیشتر و دقیق تری دارد. از طرفی لازم است سلامت افراد مصرف کننده این منبع مهم غذایی که رو به افزایش است، مدنظر قرار گیرد. (در حال حاضر متوسط میزان مصرف سرانه ماهی در کشور حدود ۶ کیلوگرم می باشد که با مقدار متوسط همین مصرف در دنیا برابر ۱۶ کیلوگرم، فاصله فاحش دارد. مصرف سرانه در ژاپن حدود ۷۰ کیلوگرم و در اروپا ۳۵ کیلوگرم می باشد). توجه

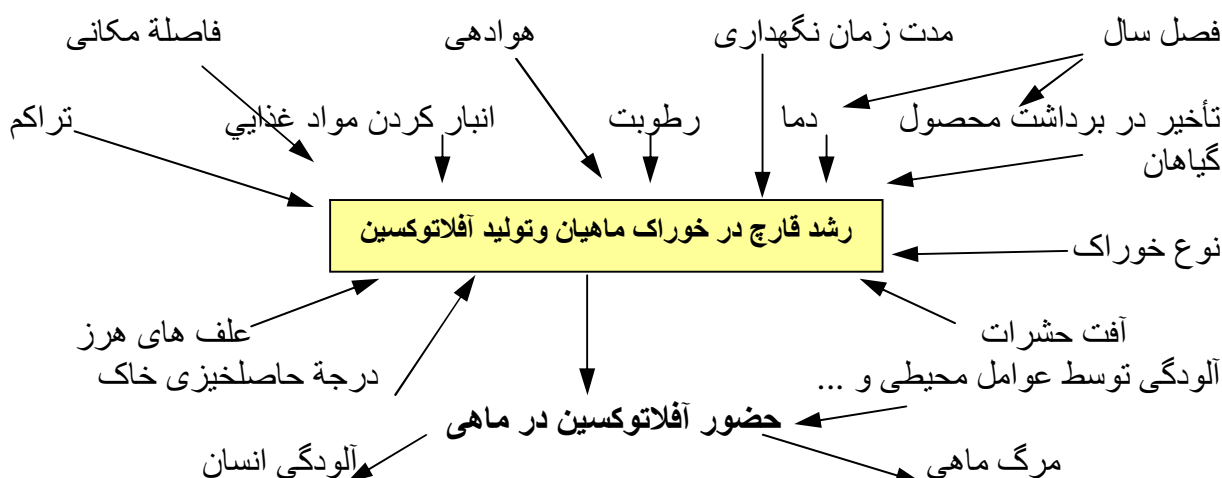
به این نکته حائز اهمیت است که امکان انتقال عوامل پاتوژن و سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین ها از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به ماهی و از طریق مصرف ماهی به مصرف کنندگان وجود دارد. در این بین شرایط خاص جغرافیایی (وجود رطوبت و دمای مناسب برای رشد قارچی و نیاز به ذخیره سازی خوراک ماهیان) امکان بروز این نوع مشکلات را زیاد می کند. در بین آلودگی های خوراک ماهیان و مواد تشکیل دهنده آن، یکی از مهمترین آن ها، آلودگی به میکوتوکسین ها (سموم قارچی) است. چنانچه طبق آمار FAO (Food and Agriculture Organization) حداقل ۲۵ درصد محصولات غذایی توسط قارچ ها و سموم ناشی از آنها آلوده می شوند. آلودگی مواد غذایی به قارچ ها و سموم ناشی از آن ها از جمله مسایل مهم بهداشتی و غذایی قلمداد می شود. در این بین آفلاتوکسین ها که بیشتر توسط کپک های جنس *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) و به ویژه گونه های *فلاووس* (*A. flavus*) و *پارازیتیکوس* (*A. parasiticus*) تولید می شود، به علت سمیت زیاد و مخاطراتی که برای مصرف کنندگان (دام و انسان) در برخواهد داشت، حائز اهمیت است. در واقع آفلاتوکسین ها گروهی در حدود ۲۰ ترکیب سمی هستند که در انواع محصولات مزرعه ای و غذاهای ذخیره شده دام و طیور، آبزیان و انسان دیده می شوند و در بین آنها چهار گروه بزرگ شامل AFB_1 , AFG_1 , AFG_2 و AFB_2 فراوانی بیشتری دارند. AFB_1 که در کبد به AFM_1 متابولیزه می شود، (و در شیر پستانداران هم یافت می شود) واجد اهمیت بیشتری است. چرا که برای همه موجودات از جمله انسان و آبزیان به ویژه قزل آلای رنگین کمان جوان بسیار سمی است. (جی، ۱۳۸۲ & رضوی، ۱۳۸۱ & فریزر و وستهوف، ۱۳۸۴ & مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶ & Quine et al., 1994 & Saad, 2005 & Gary, 1996).

این سم سرطان زا و درواقع هیپاتوکارسینوژن، موتاژن، تراژن و مسموم کننده برای کبد، کلیه و اعصاب است (رضوی، ۱۳۸۱ & Humphreys, 1996). حتی آفلاتوکسین ها می توانند به طور غیر مستقیم با اثرگذاری روی مواد مغذی جیره باعث ایجاد بیماری شوند. به عنوان مثال آنتی اکسیدان های محلول در چربی نظیر ویتامین A و محلول در آب مثل ویتامین C که به ترتیب برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی و عصبی و متابولیسم ضروریند، توسط این سموم تخریب می شوند و این خود زمینه را برای آسیب پذیری بیشتر ماهیان و انسان مصرف کننده در مقابل بیماری های باکتریایی، ویروسی و قارچی فراهم می آورد. بدین سان مشکلاتی نظیر کاهش کارایی در تولید، کاهش وزن نهایی تولید، افزایش میزان غذای مورد استفاده به منظور جبران کاهش وزن، افزایش هزینه های درمانی و ایجاد مشکلات برای سلامت عمومی جامعه از پیامدهای اقتصادی و بهداشتی این مهم می باشد. (Royes et al., 2002)

اولین شیوع گزارش شده مستند آفلاتوکسیکوزیس که سلامت ماهیان را تحت تأثیر قرار داده در سال ۱۹۶۰ در قزل آلای پرورشی اتفاق افتاده است. این ماهی ها که با غذای پلت شده حاوی پنبه دانه آلوده به آفلاتوکسین تغذیه شده بودند، دچار تومور کبدی شده و حدود ۸۵٪ آنها مردند. (Royes et al., 2002).

مصرف کنندگان ماهیان قزل آلا، ممکن است به دو صورت دچار آلودگی شوند. یک راه آلودگی به نام آلودگی مستقیم معروف است که به دلیل استقرار مستقیم قارچ های تولید کننده سم بر روی محصول یا فراورده نهایی جهت مصرف صورت می گیرد و می تواند از طریق وسایل و ابزار نگهداری ماهیان، هوا و گرد و غبار محیط و دستکاری اتفاق افتد. راه دیگر آلودگی به نام آلودگی غیر مستقیم معروف بوده که عمده علت آن از طریق آلودگی مواد غذایی مصرفی در خود ماهی اتفاق می افتد. در رطوبت بالای ۱۵٪ قارچ عامل در مواد غذایی به ویژه آنهایی که واجد کربوهیدرات بیشتری باشند، رشد می کند. لازم به ذکر است که غذای ماهی قزل آلا که به صورت گرانول ها و پلت های مخصوص با اندازه های مختلفی ارائه می شود، ترکیبی از مواد پروتئینه، کربوهیدراته و لیپیدی گیاهی و حیوانی، مواد معدنی، مینرال ها و ویتامین ها و... است و شرایط برای رشد قارچی را دارا می باشد.

اغلب قارچ های تولید کننده آفلاتوکسین ها در حرارت ۷ درجه سلسیوس شروع به رشد کرده و حداقل درجه حرارت برای تولید آفلاتوکسین ۱۳ درجه سلسیوس است. البته حرارت مناسب ۲۵ تا ۳۲ درجه است (جی, ۱۳۸۲ & Quine et al., 1994, Gary, 1996). تأخیر در برداشت محصولات مورد استفاده در جیره ماهی (انواع غلات, دانه ها و ...) درجه حاصلخیزی خاک, حضور علف های هرز در مزرعه, آفت حشرات, تراکم گیاهان, ضربه و شکستگی در پوسته یا هسته مواد غذایی و آلودگی دیگر اجزای جیره در اثر نگهداری نامناسب از عوامل دخیل می باشند. با توجه به هوای بودن قارچ ها, عمل هوادهی نامناسب قدرت رشد قارچ ها و تولید سم در آن ها را بالا می برد. از طرفی آرد کردن, به حالت پلت درآوردن و عمل آوری مناسب میزان حضور آفلاتوکسین را در مواد غذایی کمتر می کند. همین مواد غذایی در صورتیکه در شرایط نامناسب و غیر استاندارد, ذخیره و نگهداری شوند, که معمولاً به دلیل بُعد مسافت, عدم ثبات اقتصادی و کاری در ارایه خدمات مربوط و عدم آگاهی برخی از مدیران است, زمینه را برای رشد فراوان و خطرناک قارچ ها فراهم می آورد. (Quine et al. 1994 & Saad, 2005) شبکه علیت ذیل دلایل و عوامل مربوط به حضور آفلاتوکسین ها در خوراک ماهیان را بهتر می نماید:



نظر به اینکه اداره شیلات استان آذربایجان غربی اداره ای نوپاست و از حدود ۱۰ سال پیش به طور مدیریتی مستقل در استان شروع به فعالیت نموده است, مطالعات جامع و کاملی در رابطه با مسمومیت های غذایی و بالاخص آفلاتوکسین ها صورت نگرفته است و فقط گزارشاتی در این زمینه به صورت ناقص وجود دارد. در حال حاضر شرکت خوراک دام و طیور و آبزیان میلاد مهاباد, و چند شرکت تولیدی دیگر واقع در تهران نظیر شرکت های خوراک دام, طیور و آبزیان به پرور, چینه, آبزی غذا, ثمرگل و خوراک دام پارس استان تهران, به عنوان شرکت های تأمین کننده بخشی از خوراک مورد نیاز محسوب می شوند, که در فواصل زمانی مختلف از طرف مراکز پرورشی استان از شرکت های مذکور, خوراک مورد نیاز در تناژهای مختلف تهیه و برای مدتی محدود انبار می شود. از طرفی مطالعه خاصی روی وجود عوامل آفلاتوکسینی در خوراک تهیه شده برای آبزیان و خود ماهیان صورت نگرفته است, و نیاز به بررسی موضوع احساس می شود. لازم به ذکر است که در خارج کشور, مطالعات وسیعی در خصوص حضور آفلاتوکسین ها در خوراک ماهیان, اثرات آنها به ویژه اثرات هیپاتوکارسینوژنی آن در قزل آلائی رنگین کمان به عنوان یک ماهی حساس به آفلاتوکسین ها مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس مصوبه FDA (Food and Drug Administration), حد مجاز آفلاتوکسین در گوشت آبزیان و خوراک آن ها ۲۰ ppb, عنوان شده است. (جی, ۱۳۸۲ & فریزیر و وستهوف, ۱۳۸۴)

در حال حاضر با توجه به پیشرفت صنعت پرورش ماهیان سردآبی در سطح منطقه و با توجه به شرایط بسیار مساعد برای این منظور، و از طرفی افزایش تقاضای مردم منطقه و دیگر استان های کشور در خصوص این دسته از ماهیان، ضروری به نظر می رسد که مسئله شیوع قارچ های آفاتوکسین زا و به ویژه جنس معروف *آسپرژیلوس* (گونه های *فلاووس* و *پارازیتیکوس*) و سموم قارچی در جیره این دسته از آبزیان حساس به آن ها و در طول فصول سال به ویژه فصول گرم تر سال (بهار و تابستان) و با توجه به تنوع درجه حرارت در فصول مختلف و تفاوت در زمان و نحوه تهیه و ذخیره جیره، مورد بررسی دقیق قرار گیرد. قطعاً در نحوه ذخیره مواد خوراکی ماهیان تهیه شده از شرکت های مختلف تولیدی، نظر به تنوع استخر های پرورشی در سطح استان و نیز تنوع در نوع مدیریت بر اساس سطح آگهی، تحصیلات و فرهنگ و دیدگاه افراد، تفاوت هایی وجود دارد که بر میزان آلودگی جیره بی تأثیر نخواهد بود.

بدین سان این تحقیق قصد آن دارد که با در نظر گرفتن دو فاکتور یا متغیر اصلی فصل و مدت زمان نگهداری یا انبار جیره، وضعیت جیره ماهیان را از لحاظ میزان شیوع گونه های آفاتوکسین زای *آسپرژیلوس* و مقادیر باقیمانده آفاتوکسین توتال بر حسب ppb و با استفاده از روش شناخته شده ELISA در این خوراک ها در انبار های نگهداری جیره در استان، و نیز در کارخانجات تولیدی در استان های تهران و آذربایجان غربی مورد ارزیابی قرار دهد، تا در صورت اثبات وجود بیش از حد مجاز، بتوان با انجام دیگر فعالیت های تحقیقی در خصوص نحوه استاندارد نمودن آن و رفع مشکلات احتمالی موجود، اقدام نموده و در جهت کاهش ضررهای اقتصادی و افزایش بهره وری و نیز کاهش خطر سلامت افراد جامعه گام برداشت. به طور دقیق تر، اهداف توصیفی تحقیق حاضر عبارتند از:

۱- تعیین میزان شیوع گونه های آفاتوکسین زای *آسپرژیلوس* در خوراک انبارشده مصرفی ماهیان سردآبی پرورشی (قزل آلا، رنگین کمان) در استخرهای پرورشی در استان آذربایجان غربی بر حسب فصول (بهار و تابستان).

۲- تعیین باقیمانده آفاتوکسین توتال در خوراک انبارشده مصرفی ماهیان سردآبی پرورشی (قزل آلا، رنگین کمان) در استخرهای پرورشی در استان آذربایجان غربی بر حسب فصول (بهار و تابستان) به روش الایزا و بر حسب ppb.

۳- تعیین باقیمانده آفاتوکسین توتال در خوراک انبارشده تولیدی ماهیان سردآبی پرورشی (قزل آلا، رنگین کمان) در کارخانجات تولیدی خوراک دام، طیور و آبزیان استان های تهران و آذربایجان غربی بر حسب فصول (بهار و تابستان) به روش الایزا و بر حسب ppb.

هدف کاربردی این تحقیق، پی بردن به لزوم انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در خصوص فاکتورها و دیگر عوامل دخیل در حضور قارچ های آفاتوکسین زا و افزایش بیش از حد مجاز آفاتوکسین ها در خوراک ماهیان و انجام اقدامات لازم به منظور کاهش ریسک مرگ و میر در ماهیان و کاهش انتقال عوامل مذکور به انسان است.

پیشینه تحقیق: همچنان که عنوان شد، تحقیقات خاص و منتشر شده ای در خصوص حضور آفاتوکسین ها در خوراک ماهیان قزل آلا، رنگین کمان تولیدی شرکت های تولید کننده و در انبارهای نگهداری خوراک، به دست نیامد. ضمن مراجعه به اداره کل شیلات استان و مرکز تحقیقات شیلات ایران در تهران و سؤال از مسئولین امر، به وجود تلفات در بعضی از استخرهای پرورشی به دلیل مسمومیت های غذایی ماهی ها اشاره که لزوم انجام تحقیقات در این خصوص، مورد توجه و تأیید قرار گرفت.

اکثریت تحقیقات چاپ و منتشر شده در خصوص خوراک دام یا طیور بوده که در ذیل به مواردی اشاره می شود:

در تحقیقی توسط دکتر توتونچیان در سال ۱۳۸۲ در مورد تعیین مقادیر آفاتوکسین ها در مواد خوراکی دام و طیور استان های آذربایجان غربی و شرقی صورت گرفته است، از روش (TLC

(Thin Layer Chromatography) - برای این منظور استفاده شده و مقدار آفلاتوکسین اندازه گیری شده به ویژه در مورد منابع پروتئینی نظیر پور گوشت، بیش از حد استاندارد به دست آمده است. (توتونچیان، ۱۳۸۲)

Miguel, A. و همکارانش در تحقیقی با عنوان پتانسیل تولید آفلاتوکسین استرین های آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از غذاهای طیور در اسپانیا، ضمن مطالعه بر ۱۲۶ نمونه قارچی متعلق به گروه آسپرژیلوس فلاووس، متوجه شدند که ۴۹ استرین (۳۹%) در 28°C و به مدت ۱۰ روز، توانایی تولید آفلاتوکسین را بر محیط کشت Crushed moist wheat medium داشتند و ۱۶ استرین (۱۳%) بر روی محیط کشت Aflatoxin-producing ability medium فلورسنس ویژه را از خود نشان دادند. غلظت متوسط آفلاتوکسین ها، به ترتیب در دو محیط کشت مابین ۱۰۸۸ تا ۴۲۹۴ میکرو گرم در کیلوگرم (g/Kg) و ۲۵۷ تا ۸۷۷ میکروگرم در کیلوگرم (g/Kg) بوده است. (Miguel, 1986)

در تحقیقی دیگر توسط Pascal Baudurent در فرانسه با موضوع بررسی قارچ شناسی و میکروبیولوژیکی بر اجزاء و مخلوط غذای طیور در جزیره رونیون فرانسه که بر روی ۱۵۰ نمونه انجام گرفته است، در بین ۱۱۸ گونه آسپرژیلوس فلاووس، ۴۲ مورد (۳۵/۶%) آفلاتوکسین زا بوده اند و بیشتر نمونه های ذرت زرد بالاترین میزان آلودگی به استرین های آفلاتوکسین زا را داشته اند. در بین ۶۶ نمونه میکس تست شده، فقط ۲۴ مورد (۳۶%) به آفلاتوکسین آلوده بوده اند. میزان آلودگی از مقادیر بسیار ناچیز تا ۲۲ نانوگرم در گرم مادی غذایی متفاوت بوده است. (Baudurent, 1990)

در بررسی ای دیگر توسط T.K.Dutta و P.Das در هندوستان با عنوان جداسازی استرین های آفلاتوکسین زا و جداسازی آفلاتوکسین B₁ از غذای دام، که بر روی ۲۵۶ نمونه غذای دام در شمال هندوستان انجام شده است، از ۱۹۸ نمونه، آسپرژیلوس فلاووس با پتانسیل تولید آفلاتوکسین ۷۶% و از ۱۵ نمونه آرازیتیکوس با پتانسیل تولید آفلاتوکسین ۸۶% جدا شده است. روش های جداسازی آفلاتوکسین در این تحقیق TLC و ELISA بوده است و میانگین مقادیر بدست آمده آفلاتوکسین حدود ۰/۰۳ ppm بوده است. در این مطالعه اختلاف فصلی شیوع و سطح سم در خوراک ها ثبت شده است، چنانچه مقدار آنها در طی بارندگی های موسمی و بعد از آن بالاتر رفته است. (Dutta et al, 2001)

در تحقیقی دیگر توسط O.L.Brekke و همکارانش با عنوان آفلاتوکسین در ذرت، غیر فعال نمودن با آمونیاک و سنجش بیولوژیکی در ماهی قزل آلا، میزان بار آلودگی به آفلاتوکسین در نمونه های ذرت مورد استفاده در غذای ماهیان قزل آلا، ۱۸۰ g/Kg؟ گزارش شده است و اثرات هپاتوکارسینوژنی در ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار گرفته است. نیز بی اثر نمودن آفلاتوکسین توسط مقادیر مشخص از آمونیاک و متعاقباً کاهش اثرات هپاتوکارسینوژنی نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Brekke et al, 1977).

در تحقیقی با عنوان شمارش و شناسایی گروه های آسپرژیلوس و پنی سلیوم در غذاهای طیور در آرژانتین، توسط C.Magnoli تعداد ۱۸۰ نمونه از غذاهای طیور در طی سال های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۷ از کارخانجات جنوب ایالت کوردوبای آرژانتین جمع آوری شد. در این تحقیق عمده آسپرژیلوس ها شامل گونه های فلاووس و پارازیتیکوس، بوده اند با شمارش متوسط مابین 10^3 تا 10^4 cfu/g. هنگامی که نمونه ها به مدت یک هفته در حرارت ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند، تولید آفلاتوکسین به وسیله استرین های آسپرژیلوس فلاووس به این صورت اتفاق افتاده است که از ۴۵ مورد بررسی شده، ۲۱ مورد (۴۷%) آفلاتوکسین تولید کردند. AFB₁ با میزان (g/Kg) ۱۸۱ تا ۱۴۵۴۵ و AFB₂ به میزان (g/Kg) ۶ تا ۳۶۴۰ تولید شده است. این تحقیق نشان داده است که پتانسیلی برای تولید آفلاتوکسین به وسیله گروه flavi آسپرژیلوس وجود دارد. (Magnoli, 1998)

بر اساس مطالعات Hendricks میزان LD₅₀ (دوز عامل مرگ در ۵۰% نمونه ها) برای آفلاتوکسین در یک قزل آلی ۵۰ گرمی چیزی مابین ۵۰۰ ppb تا ۱۰۰۰ (برابر ۰/۵ الی ۱ میلی گرم

در کیلوگرم) می باشد. و اگر مصرف روزانه 0.4 ppb الی 1 از AFB_1 به طور مستمر انجام شود، در طی یک سال تومورهای کبدی حادث خواهد شد. (Hendricks *et al*, 1998)

در گزارشات FAO منتشر شده در FAO web library, مقدار LD_{50} برای هر کیلوگرم وزن ماهی قزل آلا رنگین کمان در حال حاضر 0.8 mg/kg عنوان شده است. (سایت اینترنتی مربوطه) در تحقیقی توسط Bintvihok, A. و همکارانش بر 150 نمونه غذای میگوی جمع آوری شده از مناطق شرقی و جنوبی تایلند، در فاصله مارچ 1997 لغایت فوریه 1998 ، مقادیر آفاتوکسین های B_1 , B_2 , G_1 و G_2 مورد آنالیز قرار گرفت و مقدار آلودگی به AFB_1 بین 0.03 ppb تا 0.651 ppb متفاوت بوده است و مقدار دیگر آفاتوکسین ها بسیار پایین تر بوده است. در بررسی اثرات این عامل بر رشد میگوها، مشخص شده که تغذیه با جیره آلوده به مقادیر 20 ppb آفاتوکسین B_1 در طی 10 روز مستمر، باعث کاهش وزن میگوها به میزان 49 تا 59 درصد وزن اولیه، می شود. این نتایج نشان می دهد که آلودگی به آفاتوکسین می تواند منجر به آسیب های اقتصادی ناشی از کاهش رشد میگوها و کاهش تولید شود. لازم به ذکر است که آلودگی در سطح 20 ppb یا کمتر، خطرات بسیار کمی برای سلامتی انسان داشته است. (Bintvihok *et al*, 2003)

Khan, M. J و همکارانش در کنستانتره های معمولی دام، طیور و آبزیان بنگلادش با 8 ترکیب اصلی آرد ذرت، کنجاله سویا، آرد گندم، سیوس گندم، پوسته برنج، روغن کنجد، روغن خردل و آرد ماهی، مقادیر Total AFT و AFB_1 را به ترتیب بین $15/1$ ppb تا $175/3$ ppb و $1/58$ ppb تا $12/8$ ppb اعلام نموده اند. (Khan *et al*. 2001)

در تحقیقی دیگر توسط Bhatti, B.M. و همکارانش، 3230 نمونه اجزای گیاهی و دامی کنستانتره های غذایی دام، در طی 5 سال در پاکستان، به منظور ارزیابی مقادیر آفاتوکسین B_1 مورد آزمایش قرار گرفت. در کلیه نمونه ها مقادیر این عامل بین 13 ppb تا 78 ppb بوده است. هیچ نوع همبستگی بین سطوح آفاتوکسین با ماه جمع آوری در طول سال و با تغییرات در دما و رطوبت دیده نشد. در ضمن میانگین مقدار غلظت آفاتوکسین در مواد متشکله کنستانتره نظیر برنج، پوسته برنج، سیوس گندم، نان گندم، ذرت، آرد ماهی، پودر خون، پودر استخوان، گلوتن 30 و 60 درصد ذرت، آرد تخم آفتابگردان، کنجاله سویا و کنجاله کتان، بالاتر از سطح 20 ppb (سطح سالم تشخیص داده شده توسط FDA) بوده است. (Bhatti *et al*. 2001)

Benkerroum, S. و همکارانش 70 نمونه غذای طیور مشتمل بر ذرت، جو، پوسته گندم، پودر ماهی، سویا، آرد تخم آفتابگردان و کلزا، به منظور بررسی آلودگی قارچی مورد بررسی قرار داده است. 10 جنس مختلف قارچی، مورد شناسایی قرار گرفت که دو جنس پنی سلیموم و اسپرژیلوس به ترتیب با 35 و $20/4$ درصد، بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده بود. دیگر جنس های شناخته شده شامل فوزاریوم، آلترناریا، تریکودرما، کلاوسپوریوم، ورتی سلیموم، موکور، رازیوپوس، و یولوکلاپیوم بودند. (Benkerroum *et al*, 2001)

در تحقیقی توسط Abdelhamid, A.M. و همکارانش در مصر، مقدار آفاتوکسین B_1 در غذای ماهی 749 ppb تا 3388 ppb گزارش شده است و عنوان شده است که اتوکلاو نمودن غذای حاوی مایکوتوکسین ها بهترین روش تخریب این عوامل در بین دیگر روش های فیزیکی بوده است. ولی به این نکته نیز اشاره شده است که اتوکلاو کردن با وجود آنکه باعث کاهش مقدار آفاتوکسین در بدن ماهی می شود، با این وجود هنوز این ماده در عضلات و استخوان های بدن ماهی انباشته است. (دامنه تخریب آفاتوکسین $41/8$ تا $42/9$ مقدار اولیه عنوان شده است) (Abdelhamid *et al*, 1998)

با توجه و بهره گیری از روش های ارائه شده و پیشینه تحقیقاتی که عنوان شد، در تحقیق حاضر که پژوهشی توصیفی اکتشافی (Survey) و از دسته مشاهده ای – مقطعی (cross-sectional: observational sectional) می باشد، به منظور گردآوری اطلاعات، در خصوص تولید داده ها به صورت میدانی و

جهت تهیه چارچوب نظری بحث به صورت کتابخانه ای اقدام شده است. به گونه ای که ۹۸ نمونه از خوراک ماهی مورد مطالعه، در فاصله ماه های فروردین تا مهرماه ۱۳۸۶ شمسی، به صورت راندوم قشری (در مورد استخرهای پرورشی) و راندوم ساده (در مورد کارخانجات تولید خوراک آبزیان در استان های تهران و آذربایجان غربی) و بر اساس دستورالعمل ها و استاندارد های موجود (که در فصول آتی در مورد آنها توضیح داده خواهد شد) نمونه برداری شد.

به منظور تعیین میزان شیوع گونه های آفاتوکسین زای اسپرزیلوس در خوراک ماهیان سردآبی، به میزان یک کیلوگرم از خوراک موجود در انبار کارخانجات و مراکز پرورشی در پانزدهم هر ماه شمسی، برداشت شده و پس از انتقال و آماده سازی در آزمایشگاه، کشت، تشخیص و شمارش بر اساس استاندارد شماره ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران و با استفاده از محیط های عمومی سابارو دکستروز آگار (Sabouraud-dextrose agar) و مالت اکستراکت آگار (Malt extract agar) انجام گرفت. همچنین جهت اندازه گیری باقیمانده آفاتوکسین توتال در خوراک ماهیان سردآبی، پس از نمونه گیری و فریز نمودن نمونه ها (جهت جلوگیری از تغییرات احتمالی مقادیر آفاتوکسین موجود)، کلیه نمونه ها در یک زمان آماده سازی شده و به روش-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) که به علت سرعت در تشخیص، دقت فوق العاده و حساسیت زیاد به عنوان یک تست غربالگر خوب در این زمینه مطرح است، مورد آنالیز قرار گرفتند. در این راستا از کیت ویژه آفاتوکسین توتال (Agra Quant) در محدوده ۴۰-۴ ppb از شرکت اتریشی. Romer lab که توسط شرکت ایرانی فرایند دانش آراین خریداری و وارد می گردد، استفاده شده و پس از انجام مراحل کار بر اساس استاندارد ۷۲۷۲ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران و دستور العمل بروشور کیت مذکور، مقدار آفاتوکسین با استفاده از دستگاه ELISA reader محاسبه شده است.

ذکر این نکته لازم است که اعتبار ابزار و روش های به کار گرفته شده در خصوص اندازه گیری متغیرهای مورد مطالعه، به تأیید صاحب نظران و متخصصین امر رسیده است. در خصوص پایایی ابزار و روش های به کار گرفته شده باید اذعان داشت که چون این ابزارها به کرات در مطالعات داخلی و خارجی از سوی پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته و هم چنین مورد تأیید متخصصین امر در این راستا می باشد، و از استانداردهای جهانی و پشتوانه علمی صاحب نظران برخوردار است، چنانچه سرعت در کار، دقت فوق العاده و حساسیت بسیار زیاد را از ویژگی های آن عنوان نموده اند، لذا پایایی ابزار نیز مورد تأیید بوده و از دقت زیاد در سنجش متغیرها برخوردارند. در تحقیق حاضر، از شاخص های آمار توصیفی (میانگین، فراوانی، استاندارد ارور، نمودار و...) جهت تنظیم، تلخیص و به عرضة نمایش درآوردن داده ها در راستای تحلیل سؤالات پژوهش و نیز آزمون های معنی دار استنباطی تی- تست گروه های مستقل، کا- اسکویر یا آزمون خی (Chi-Square) و... با استفاده از بسته آماری (نرم افزار) spss. Ver. 16 و Excel 2003 استفاده شده است.

در این بین بهره وران اصلی طرح، سازمان تحقیقات و صنایع شیلات کشور، اداره کل نظارت بر غذای وزارت بهداشت، سازمان دامپزشکی کل کشور، کارخانجات تولیدی خوراک دام، طیور و آبزیان و تولیدکنندگان و پرورش دهندگان ماهیان سردآبی خواهند بود که در صورت اثبات وجود عامل بیش از حد مجاز، با توجه به اثرات نامطلوب آن، با اعمال روش های صحیح در جهت کاهش ضایعات حاصل در این صنعت و افزایش بهره وری و حفظ بهداشت و سلامت جامعه اقدام نمایند.

امید است تحقیق حاضر بتواند، با بررسی دقیق متغیرهای مورد مطالعه در زمینه مورد بحث، گامی هر چند کوچک در جهت تبیین روش ها و راهکار های عملی به منظور افزایش بهره وری در صنعت پرورش آبزیان و همچنین اعتلای سلامت مصرف کنندگان، بردارد.

فصل اول:

کلیات

بخش اول :

۱-۱ : مایکوتوکسین ها

۱-۱-۱ : تعریف و خواص عمومی:

از زمان های قدیم، انسان می دانست که خوردن بعضی گونه های قارچ های بزرگ ممکن است سلامتی او را به خطر اندازد. ولی تا همین چند دهه اخیر وجود کپک ها را در مواد غذایی به عنوان یک مشکل اساسی تلقی ننموده و به عنوان خطر سلامتی مطرح نمی کرد. درک اینکه متابولیت های بعضی از کپک های مواد غذایی مسؤول بیماری حیوانات و مرگ آنها می باشند، در سال ۱۹۶۰ اتفاق افتاد. در آن سال مسمومیتی شدید در بین بوقلمون های یک فارم در شرق انگلستان منجر به مرگ یکصد بوقلمون گردید که در آن زمان آن را به نام بیماری ناشناخته شناختند. بعدها ثابت شد که این پرندگان در نتیجه وجود سم قارچی آفلاتوکسین در غذای پلت شده که بخش بزرگی از غذاهای این پرندگان را تشکیل می داد، مرده اند. مطالعات بعدی نشان داد که این مشکل تنها به بوقلمون محدود نمی شود، بلکه جوجه اردک ها و جوجه قرقاول ها و ماهیان قزل آلا را هم تحت تأثیر این بیماری قرار گرفته اند و حساسیت بسیار نشان داده اند. مقارن همین زمان گزارش هایی از سایر کشورها نیز به دست آمد و در نهایت با مطالعات گسترده محققان توانستند عامل این بیماری را که از مایکوتوکسین ها بودند، جداسازی کنند (رضویلر، ۱۳۸۱ و Quine et al, 1994).

در میان قارچ های رشته ای یا کپکی، قارچ های زیادی وجود دارد که تولید اجسام میوه ای ماکروسکوپیکی نمی کنند ولی با این حال به دلیل توانایی رشد بر روی غذاهای انسان و حیوانات و مواد خام مورد استفاده در تولید آنها مهمند. بسیاری از آنها قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه ای هستند، که برخی از آن ها پیگمان های خارجی هستند، برخی خواص آنتی بیوتیکی دارند و بعضی دیگر برای گیاهان، حیوانات و انسان سمی می باشند. در این بین مایکوتوکسین ها آن دسته از متابولیت های قارچی هستند که متعاقب مصرف غذای آلوده به آنها موجب بیماری یا مرگ انسان یا حیوانات شده یا باعث بیماری می شوند که بیماری حاصل از آنها را به نام « مایکوتوکسیکوزیس » خوانند. به عبارتی سموم تولید شده توسط کپک ها را به نام مایکوتوکسین خوانند که دارای ریشه یونانی مایکس (mykes) به معنی قارچ و کلمه لاتین توکسیکوم (toxicum) به معنی سم بوده و مسمومیت با آنها شامل مسمومیت با قارچ های بازیدیومیست (Basidiomycetes) نمی شود. این مواد در واقع متابولیت های ثانویه ای هستند که نقشی در ارتباط با رشد قارچ ها ندارند و اغلب هیدروکربن های آروماتیک با ساختمان حلقوی منفرد با وزن مولکولی پایین (حدود ۵۰ دالتون) تا گروه های ۶ و ۸ حلقه ای با وزن مولکولی بیش از ۵۰۰ دالتون، می باشند. (رضویلر، ۱۳۸۱)

حدود ۴۰۰ متابولیت مسمومیت زا شناخته شده و ترکیبات جدیدی هم به این لیست غالباً اضافه می شود. از انواع شناخته شده، آفلاتوکسین ها، توکسینهای فوزاریوم و اوکراتوکسین ها مهمترین آنها هستند. توکسین هایی که به عنوان بالاترین پتانسیل بیماریزایی در انسان و آلوده کننده مواد غذایی مورد نگرانی در بهداشت عمومی می باشند (رضویلر، ۱۳۸۱).

۲-۱-۱ : قارچ های تولید کننده توکسین :

توکسین زایی چند گروه از قارچ ها شامل چیتريدها (Chytrids)، هایفومیست ها (Hyphomycetes) و اوومیست ها (Oomycetes) که جزو قارچ های آبزی هستند، ثابت نشده است. لذا میکولوژیست ها در این ارتباط به طور عمده به قارچ های خاک زی توجه دارند.

برخی از گونه های موکور (*Mucor*)، آبسیدیا (*Absidia*)، و رایزوپوس (*Rhizopus*) در بیماری های قارچی حیوانات نقش دارند. گرچه گزارشاتی مبنی بر توانایی تولید متابولیت های سمی توسط این قارچ ها وجود دارد، اما هیچ گواه مستدلی مبنی بر دخالت این ها در مایکوتوکسیکوزیس وجود ندارد. در حال حاضر بیش از یکصد کپک شناخته شده وجود دارد که تولید مواد سمی می کنند.

برخی کپک ها حتی مربوط به جنس های مختلف ممکن است یک مایکوتوکسین مشابه را تولید کنند. مثلاً هر دو قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و *آسپرژیلوس پارازایتیکوس* (*Aspergillus parasiticus*)، آفلاتوکسین تولید می نمایند و دو قارچ *آسپرژیلوس اوکراسئوس* (*A. ochraceus*) و *پنی سلیوم ویریدیکاتوم* (*Penicillium viridicatum*)، تولید اوکراتوکسین می کنند. در مقابل برخی کپک ها به طور انفرادی، دو مایکوتوکسین متفاوت یا تعدادی بیشتر را تولید می نمایند. در حال حاضر ۳ جنس معروف *آسپرژیلوس*، *پنی سلیوم* و *فوزاریوم* (*Fusarium*) به عنوان مهمترین کپک های مولد توکسین مورد توجه هستند.

۱-۱-۳: شرایط تولید مایکوتوکسین ها (جنبه های عمومی) :

بسیاری از قارچ های مولد توکسین در سراسر جهان پراکنده هستند، اما عده ای از آنها محدود به مناطق جغرافیایی خاصی می باشند. این قارچ ها توانایی تکثیر و رشد را داشته و زمانی که شرایط محیطی از قبیل رطوبت، حرارت و هوادهی در حد مطلوب (اوپتیمال) باشد، در طیف گوناگونی از سوبستراها ایجاد توکسین می نمایند. شرایط مطلوب برای تولید مایکوتوکسین ها در مورد قارچ های مختلف، متفاوت است. مثلاً برخی قارچ ها بیشترین مقدار توکسین خود را در حرارت نزدیک صفر درجه سلسیوس تولید می کنند، در حالی که بعضی دیگر از قارچ ها در دمای حدود ۲۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت توکسین زایی را دارا می باشند. به دلیل همین اختصاصی بودن سوبسترا و شرایط محیطی جهت تولید مایکوتوکسین، غالباً تفاوت های قابل توجه منطقه ای و فصلی در تولید انواع توکسین های قارچی در محصولات زراعی وجود دارد. در همین رابطه ایجاد توکسین بر روی محصولات درو نشده، دانه های انبار شده در مزرعه و سایر غذاهای حیوانی اغلب در نواحی جغرافیایی خاصی اتفاق می افتد و از طرفی زمانی که شرایط برای تولید توکسین مطلوب می باشد، فقط برخی از سویه های مربوط به یک گونه قارچی قادر به تولید توکسین خواهد بود. مایکوتوکسین ها در فراورده های انبار شده یا آرد شده غالباً ارتباط خود را با فصل یا با منطقه جغرافیایی خاص از دست می دهند، زیرا توکسین ها در خلال انبار شدن و توزیع است که تولید می شوند.

انبار کردن در شرایط نامطلوب مثلاً پوشش های منفذدار یا بالابودن رطوبت مواد انبار شده، فرصت های مناسبی برای رشد کپک و نهایتاً تولید توکسین فراهم می نماید. باید دانست که رشد کپک و تشکیل توکسین در غذاهای حیوانی و انسانی که رطوبت کمتر از ۱۳٪ دارند رخ نمی دهد. قارچ های انباری که عمدتاً *آسپرژیلوس* ها و *پنی سلیوم* ها می باشند، در رطوبت های ۱۳/۵ تا ۱۸ الی ۲۰ درصد، توانایی رشد سریع و تولید مایکوتوکسین را در حد بسیار قوی دارند. در حالی که قارچ های مزرعه ای مثل *فوزاریوم* و *پیتومایسس* ها (*Pitomyces*) ممکن است در رطوبت های بالاتر به عنوان گونه های غالب باشند و توکسین های خود را تولید کنند. پس رطوبت و حرارت از فاکتورهای اولیه محیطی می باشند که رشد کپک و لزوماً تولید مایکوتوکسین به آنها وابسته است. فاکتورهای از قبیل خشکسالی، طوفان، هجوم حشرات و آسیب های مکانیکی در خلال درو کردن محصول، تهاجم قارچی به گیاهان تغذیه ای و تشکیل مایکوتوکسین را تسهیل می کنند. به همین صورت، رطوبت فصلی هم ممکن است به اوج رسیدن تولید مایکوتوکسین را تقویت کند. البته لازم به ذکر است که شرایط مطلوب رشد قارچی ضرورتاً بهترین شرایط برای ایجاد مایکوتوکسین نمی باشد. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

مایکوتوکسین ها در غذاهای پروسس شده حیوانی و انسانی هم ممکن است تولید شده و بقا یابند. تعدادی از آنها از جمله آفلاتوکسین ها به حرارت نسبتاً مقاومند. لذا به شکل فعال در غذاهای حیوانی پلت شده یا غذاهای انسانی کنسرو شده که از اجزای آلوده به این توکسین ها تهیه شده باشند، دوام می یابند و در در صورتی که مواد غذایی انبار شده، در شرایط مرطوب نگهداری شوند و قارچ های مولد

توکسین بر روی آنها رشد نمایند، در این نوع غذاها حتی به صورت بسته بندی ممکن است مایکوتوکسین ها تولید شوند.

قابل توجه است که کپک های مولد توکسین فقط به غذای انسان و حیوان محدود نمی شوند، بلکه آن ها را می توان در محیط های خانگی هم جستجو کرد و از طرفی تولید متابولیت های سمی در هوا تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است. به هر حال بسیاری از قارچ های مولد توکسین در همه جا حاضر هستند و دارای ارتباط اکولوژیکی شدیدی با مواد مورد استفاده در تهیه غذای انسان هستند. فلور قارچی طبیعی که با تولید غذای انسانی و حیوانی در ارتباط است، اغلب گونه های *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنی سلیم* را شامل می شود. گونه های *آسپرژیلوس* و *پنی سلیم* عموماً با محصولات کشاورزی، غذاهای انسانی در خلال مراحل رشد، خشک کردن و انبار سازی آنها همراه می شوند. مایکوتوکسین ها غالباً بعد از برداشت محصول تشکیل می شوند، ولی تولید آفلاتوکسین ها قبل از برداشت ذرت، بادام زمینی و دانه های غذایی (grains) مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین مطالعات اکولوژیکی انجام گرفته در ارتباط با گونه های مولد مایکوتوکسین، شرایط رخداد، رشد و نظایر آن می تواند در تولید مایکوتوکسین، بی نهایت مهم باشد. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

مایکوتوکسین ها می توانند از طریق آلودگی مستقیم یا غیر مستقیم وارد سیستم های غذایی انسان و حیوان شوند. آلوده شدن غیر مستقیم می تواند زمانی که قسمتی از یک روند تهیه غذا قبلاً با کپک های مولد توکسین آلوده شده باشد، حتی اگر کپک ها به احتمال در خلال پروسس کردن از بین رفته یا خارج شده باشند، رخ دهد. به گونه ای که مایکوتوکسین ها اکثراً در فراورده نهایی باقی می ماند. این نوع آلودگی در غلات و دانه های روغنی نمایانگر نقطه اصلی ورود بسیاری از مایکوتوکسین ها به داخل زنجیره غذایی انسان و دام است.

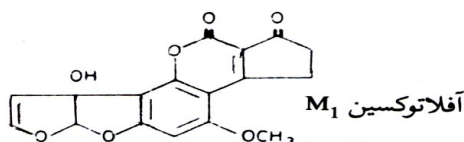
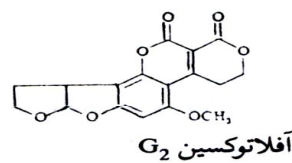
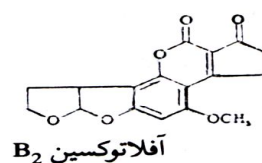
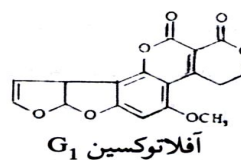
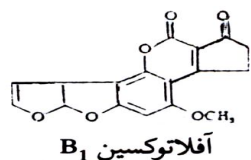
در آلوده شدن مستقیم، فراورده بعد از پروسس کردن با یک کپک مولد توکسین آلوده شده است. تقریباً تمام غذاهای انسان و دام می توانند مستعد به رشد کپک در مراحل مختلف تولید، پروسس، انتقال و ذخیره سازی باشند. تأخیر در برداشت محصولات مورد استفاده در جیره ماهی (انواع غلات، دانه ها و ...) درجه حاصلخیزی خاک، حضور علف های هرز در مزرعه، آفت حشرات، تراکم گیاهان، ضربه و شکستگی در پوسته یا هسته مواد غذایی و آلودگی دیگر اجزای جیره در اثر نگهداری نامناسب از عوامل دخیل می باشند. با توجه به هوای بودن قارچ ها، عمل هوادهی نامناسب قدرت رشد قارچ ها را و تولید سم در آنها را بالا می برد. از طرفی آرد کردن، به حالت پلت درآوردن و عمل آوری مناسب میزان حضور آفلاتوکسین را در مواد غذایی کمتر می کند. همین مواد غذایی در صورتیکه در شرایط نامناسب و غیر استاندارد، ذخیره و نگهداری شوند، که معمولاً به دلیل بُعد مسافت، عدم ثبات اقتصادی و کاری در ارائه خدمات مربوط و عدم آگاهی در برخی از مدیران است، زمینه را برای رشد فراوان و خطرناک قارچ ها فراهم می آورد. (Saad, 2005 & Quine et al., 1994)

۴-۱-۱ : شرایط تولید مایکوتوکسین ها (جنبه های اختصاصی):

۱-۴-۱-۱ : آفلاتوکسین ها (تعریف، انواع و شرایط تولید):

آفلاتوکسین ها گروهی در حدود ۲۰ ترکیب سمی هستند که به وسیله سویه هایی از *آسپرژیلوس* مانند *آسپرژیلوس فلاووس* و *آ. پارازایتیکوس* و گونه هایی مختلف از *پنی سلیم*، *رایزوپوس*، *موکور* و *استرپتومایسس* در طول مدت رشد در محل های طبیعی، شامل محصولات مزرعه ای و غذاهای ذخیره شده دام، طیور، آبزیان و انسان تولید می شوند. (Quine et al, 1994، ۱۳۷۷، اسمیت، ۱-۱-۱). ترکیبات آفلاتوکسین ها جزء ترکیبات کومارینی (بیسفورانوکومارین) هستند (تصویر ۱-۱-۱). ترکیبات مختلفی از آفلاتوکسین ها شناسایی شده اند (اندازه مولکول های تعدادی از آنها در جدول شماره ۱-۱-۱ آورده شده است) که در این میان چهار گروه بزرگ از آنها مشخص شده است که فراوانی بیشتری دارند و سایر آفلاتوکسین ها از این گروه سموم مشتق می شوند. این چهار گروه شامل AFG_1 ، AFG_2 ،

AFB₁ و AFB₂ می باشند. از انواع مختلف آفاتوکسین ها که تا کنون مشخص شده اند، علاوه بر موارد فوق الذکر، این موارد را می توان نام برد: AFG_{2a}، AFB_{2a}، AFGM₁، AFM₁، AFM₂، AFP₁، AFB₃، آفاتوکسیسکول، AF₃-oxide، AFRB₂، AFQ، AFLM₁، AFLH₁، AFB-، AFO-alkyl، 2 (مرتضوي و طباطبائي، ۱۳۷۶)



تصویر شماره (۱): فرمول شیمیائی آفاتوکسین های B₁، B₂، G₁ و M₁.

جدول ۱-۱-۱: اندازه مولکول های آفاتوکسین های مهم مواد غذایی (Ruston, 1997)

Aflatoxin	Molecular Size (?)
B ₁	5.18
B ₂	5.18
G ₁	6.50
G ₂	6.50

آفاتوکسین های M₁ و M₂ متابولیت های هیدروکسیله شده B₁ و B₂ هستند که از شیر حیوانات شیروار جدا شده اند. AFB₁ عمدتاً گسترش بیشتری دارد و موارد کارسینوژنیک آن بیشتر است. این مایکوتوکسین ها بر اساس حالت و رنگ فلورسنت خود در لایه نازک کروماتوگرام وقتی که در زیر نور اولترایوله بررسی می شوند، نام گذاری شده اند. AFB₁ و AFB₂ فلورسنت آبی و AFG₁ و AFG₂ فلورسنت سبز تولید می کنند. سایر فرم های آفاتوکسین، اشکال متابولیکی هستند که از داخل بدن حیوانات بعد از خوردن یا استفاده از آفاتوکسین ها منشأ می گیرند (مرتضوي و طباطبائي، ۱۳۷۶)

(Gary^b, 1996)

از خصوصیات این سموم این است که ترکیبات پایداری در محصولات غذایی تولید می کنند و بعد از خوردن در بدن باقی می مانند. این سموم می توانند بعد از در معرض قرار گیری با آب گرم ۲۵۰ درجه سلسیوس و یا حرارت مرطوب ۱۲۰ درجه سلسیوس نیز به فعالیت خود ادامه دهند. ولی در برابر نور خورشید حساس هستند. آفاتوکسین ها از نظر مولکولی، وزن کمی دارند (همچنان که قبلاً عنوان شد) و در حالت طبیعی غیر آنتی ژنیک هستند. در ذرت وقتی اسپرژیلوس فلاووس رشد می کند معمولاً تولید آفاتوکسین های B₁ و B₂ می کند. در حالیکه آ پارازیتیکوس هر چهار رده بزرگ آنها را تولید می کند. در جو فقط آفاتوکسین AFB₁ با غلظت های پایین تولید می شود. در حالت کلی برای تولید این سموم نیاز به رطوبت بالاتر از ۱۵ درصد و درجه حرارت حداقل ۲۵ درجه می باشد (Quine et al., 1994).

این قارچ ها قادرند در دانه های نظیر ذرت، تخم پنبه و بادام زمینی در تمامی مراحل رشد تا دروي محصول استقرار یابند و سم تولید کنند. در دانه های سویا و سایر دانه های کوچک، آفلاتوکسین ها عمدتاً در طول ذخیره سازی تولید می شوند (اسمیت، ۱۳۷۷). تقریباً نصف سویه های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آپارازایتیکوس* قابلیت تولید سم را در حالات مساعد محیطی دارند. رطوبت بالا در طی مدت قبل از برداشت محصول، انتقال و ذخیره سازی، آسیب حشرات، خشکسالی و آسیب های مکانیکی می توانند باعث وارد آوردن آسیب به محصولات کشاورزی شوند و محیط را برای رشد سویه های قارچی مهیا کنند (Quine et al. 1994). لازم به ذکر است استرس کم آبی، درجه حرارت بالا و آسیب های ناشی از حشرات در گیاهان میزبان از بزرگترین فاکتورهای تعیین کننده در آلودگی قارچی و تولید توکسین معرفی شده اند. به همین نحو فقر حاصلخیزی خاک، تراکم بالایی گیاهان و رقابت علف های هرز با افزایش رشد قارچی و تولید توکسین وابسته اند. آلودگی پیش از برداشت آفلاتوکسین در گیاهانی مانند بادام زمینی و ذرت، با درجه حرارت بالا، شرایط خشکسالی طولانی مدت و فعالیت زیاد حشرات حمایت می شود. در حالی که تولید آن پس از برداشت در محصولات مذکور با درجه حرارت گرم و رطوبت بالا حمایت می گردد. (Saad, 2005)

برای تشکیل آفلاتوکسین ها، طیف درجه حرارت مناسب حدود ۲۵ الی ۳۲ درجه سلسیوس (۷۸ تا ۹۰ درجه فارینهایت) می باشد. اگرچه درجه حرارت های کمتر از ۵۵ درجه فارینهایت برای مدت دو روز نیز می تواند باعث تولید آفلاتوکسین شود. آفلاتوکسین در غلات در درجه رطوبت حدود ۱۲ الی ۲۸ درصد تولید می شود. (Gary, 1996) نیز در انواع مواد غذایی با منشأ دامی، نظیر گوشت (قرمز، سفید و آبیان)، شیر، تخم مرغ و فراورده های مختلف تهیه شده از آنها دیده شده است و این به علت مصرف مواد غذایی آلوده توسط دام ها می باشد که منجر به حضور مقادیر مختلف آفلاتوکسین در این محصولات خواهد شد. (Saad, 2005)

همچنان که عنوان شد تشکیل مایکوتوکسین بر اساس شرایط محیطی، سوبسترا و کپک مولد توکسین متفاوت است. مثلاً *آسپرژیلوس فلاووس* در حال رشد بر روی ذرت، به طور اولیه آفلاتوکسین ها B_1 و B_2 را تولید می کند در حالیکه *آسپرژیلوس پارازایتیکوس* تمام ۴ نوع آفلاتوکسین اصلی یعنی B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 را تولید می کند. لیکن هیچکدام از آنها بر روی سویا میزان قابل توجهی از آفلاتوکسین B_1 را تولید نمی کنند. تنها در حدود نیمی از سویه های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آپارازایتیکوس* در شرایط محیطی اپتیمال تولید مایکوتوکسین می کنند. کاهش اکسیژن نیز تشکیل آفلاتوکسین را کاهش می دهد. در ذرت و سایر غذاهای حیوانی تحت تأثیر *آسپرژیلوس*، خرد شدن و یا آسیب پوشش دانه توسط حشرات، تهاجم کپک را تسهیل می کند. تشکیل آفلاتوکسین زمانی که شرایط مساعد وجود داشته باشد. فقط در عرض چند ساعت صورت می گیرد. *آسپرژیلوس فلاووس* و *آپارازایتیکوس* از کپک های معمول در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند و لذا موادی از قبیل بادام زمینی، ذرت، تخم پنبه بلغور شده و طیف وسیعی از دانه های درختی مثل بادام، پسته و غیره، در شرایط مناسب عنوان شده آلوده به این کپک ها شده و دارای آفلاتوکسین خواهند بود.

لازم به ذکر است که غذاهای حیوانی در مقایسه با غذاهای مورد مصرف انسان مدیریت نامطلوب تری دارند و بررسی های اپیدمیولوژیک در برخی از مناطق دنیا نشانگر حضور و ادامه یافتن مسئله آفلاتوکسین ها در این غذاها می باشد. گرچه در ابتدا تولید آفلاتوکسین به عنوان یک مسئله بعد از برداشت کالاهای ضعیف انبار شده مطرح بود، ولی آلودگی محصولات مهمی از قبیل بادام زمینی، ذرت و تخم پنبه در خلال دوران فعال رشد گیاه در داخل مزرعه است، که رخ می دهد.

در مورد فاکتورهای محیطی تأثیر گذار در تولید آفلاتوکسین در محصولات در حال رشد به نظر می رسد حرارت، مهمترین فاکتور می باشد. رطوبت خاک و استرس خشکسالی، که قبلاً اشاره شد، نیز از فاکتورهای مهم در آلوده شدن محصولات آسیب دیده پس از برداشت می باشد. مطالعه ای چهار ساله بر روی فاکتورهای متأثرکننده آلودگی آفلاتوکسینی ذرت در خلال رشد محصول، تأکید کرد که استرس آب

به عنوان یک فاکتور عمده می باشد و لذا کاهش این آلودگی به طور قابل توجهی می تواند با برنامه های مناسب آبیاری به دست آید. (Saad, 2005)

۱-۵-۱ : قارچ های تولید کننده آفلاتوکسین (ویژگی ها و روش های کشت و جداسازی)

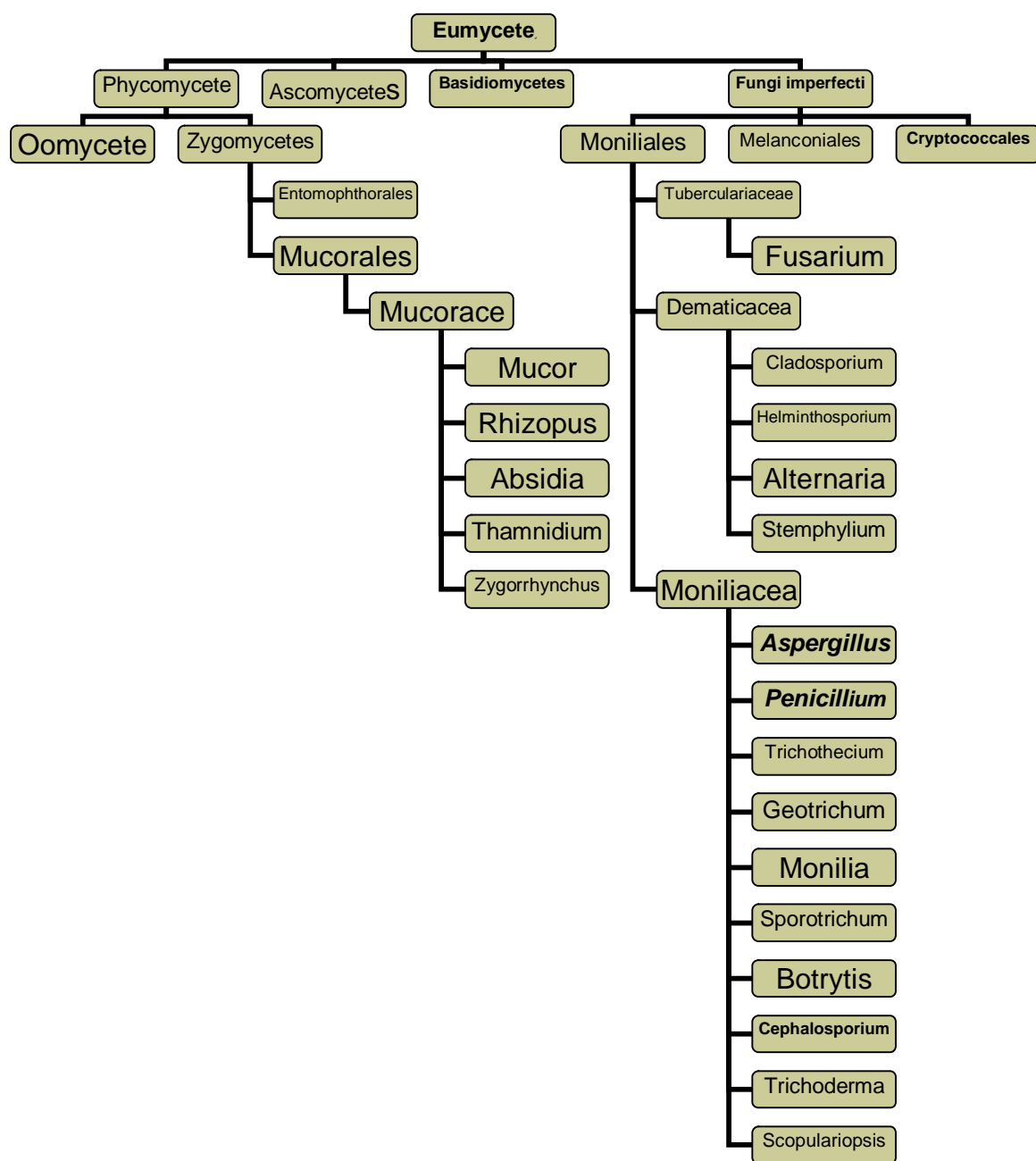
همچنان که عنوان شد آفلاتوکسین ها به وسیله سویه هایی از *آسپرژیلوس* مانند *آسپرژیلوس فلاووس* و *آپارازایتیکوس* و گونه هایی مختلف از *پنی سلیم*، *رایزوپوس*، *موکور* و *استریپتومایسس* در طول مدت رشد در محل های طبیعی، شامل محصولات مزرعه ای و غذاهای ذخیره شده دام، طیور، آبزیان و انسان تولید می شوند. (Quine et al, 1994، ۱۳۷۷، اسمیت)

در این بین با توجه به اهمیت بسیار زیاد دو جنس معروف *پنی سلیم* و *آسپرژیلوس* در ادامه به توضیح در خصوص این دو جنس پرداخته و غالب بحث با توجه به تحقیق حاضر به *آسپرژیلوس* اختصاص یافته است.

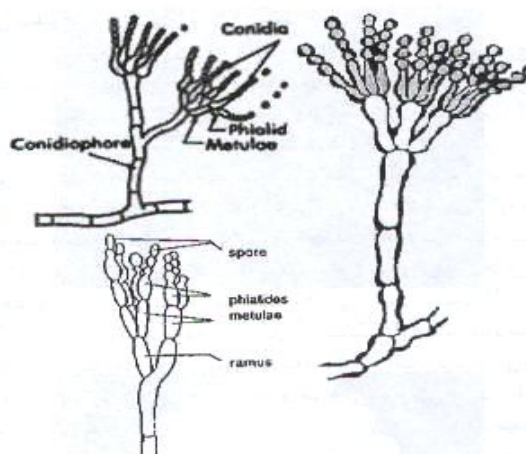
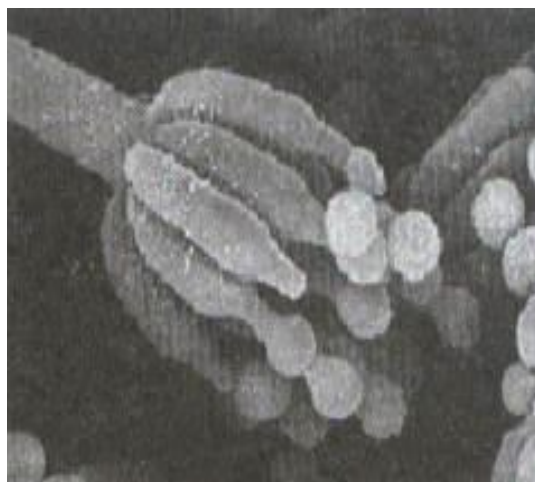
۱-۵-۱-۱ : جنس پنی سلیم (*Penicillium*) :

۱-۵-۱-۱-۱ : خصوصیات عمومی: این قارچ جزو کپک های ناقص (*Imperfect Funngi*) ، از رده دیوترومایست ها (*Deutromycetes*) و راسته مونیلیالس (*Moniliales*) و خانواده مونیلیاسه (*Moniliaceae*) می باشند. (شکل شماره ۱-۱-۲) قارچ های این جنس در تمام نقاط پراکنده هستند. این قارچ ها به خصوص بر روی مرکبات ، میوه جات و مرباجات، فراورده های آردی و خلاصه بر روی کلیه مواد خوراکی که دارای رطوبت نسبی لازم باشند، نشو و نمو می کنند و ایجاد کپک های به رنگ سبز و آبی می نمایند. کنیدی های پنی سلیم در هوا، خاک و در بسیاری از نقاط دیگر یافت می شوند. این جنس شامل بیش از ۱۳۷ گونه مختلف می باشد که بعضی از آنها از نظر احتیاجات غذایی کم توقع بوده و بر روی اکثر محیط های کشت رشد و نمو می کنند. در حالی که بعضی از گونه های این جنس هم از نظر محیط کشت متوقع بوده و فقط بر روی محیط های خاصی رشد و نمو می کنند. گونه های مختلف پنی سلیم به میوه جات حمله نموده و موجب فساد و خرابی آنها می شوند. این گونه فسادها به نام فسادهای سبز و آبی معروف هستند. مثلاً پنی سلیم ایتالیکوم (*P. italicum*) و پنی سلیم دیژیتاتوم (*P. digitatum*) پاتوژن های مرکبات بوده و یا پنی سلیم اکسپانسوم (*P. expansum*) که عامل فساد سیب های انباری هستند. خسارت آنها بر روی چرم ها و منسوجات به اندازه *آسپرژیلوس* نمی باشد. بعضی از پنی سلیم ها نیز باعث بروز بیماری هایی در انسان و حیوان می شوند. ولی اهمیت بیماری زایی آنها کمتر از *آسپرژیلوس* ها می باشد و یکی از مهمترین آنها توانایی تولید آفلاتوکسین ها و دیگر مایکوتوکسین ها در مواد غذایی و انتقال آنها به انسان و دام می باشد که در جداول پیوست الف به آنها اشاره شده است. (مرتضوی و همکاران^a، ۱۳۸۴)

۱-۵-۱-۱-۲ : شناسایی : نحوه زندگی پنی سلیم ها بسیار شبیه به طرز زندگی *آسپرژیلوس* ها است. ولی اندام های بارز آنها از نظر مورفولوژی با *آسپرژیلوس* تفاوت فاحش دارد. میسلیم پنی سلیم ایجاد کنیدیوفورهای ساده، طویل و راست می کند. کنیدیوفورها در فاصله دوسومی طول پایه اصلی خود به طور متقارن و یا نامتقارن منشعب شده و شکل فرچه و جارویی که معرف جنس پنی سلیم است، به خود می گیرند. هر یک از شاخه های کنیدیوفورها منتهی به تعدادی استریگما می شود که بر روی آن ها کنیدی ها، که تعداد آن ها در بعضی اوقات تا ۵۰ عدد هم می رسد، به صورت زنجیر طولی تشکیل می گردد. کنیدی های پنی سلیم از کروی تا بیضوی تغییر می کند و به ندرت ممکن است به شکل استوانه ای دیده شوند. سطح خارجی آن ها معمولاً صاف اما گاهی هم احتمال دارد که زبر و خشن باشند. کنیدی های سبز، آبی یا زرد پنی سلیم، باعث ایجاد رنگ به خصوص پرگنه های این قارچ ها که در گونه های مختلف متفاوت است می شود. در صورتی که کنیدی ها در محیط مناسب قرار گیرند، به سهولت جوانه زده و ایجاد میسلیم می کنند. (مرتضوی و همکاران^a، ۱۳۸۴) (شکل ۱-۱-۳)



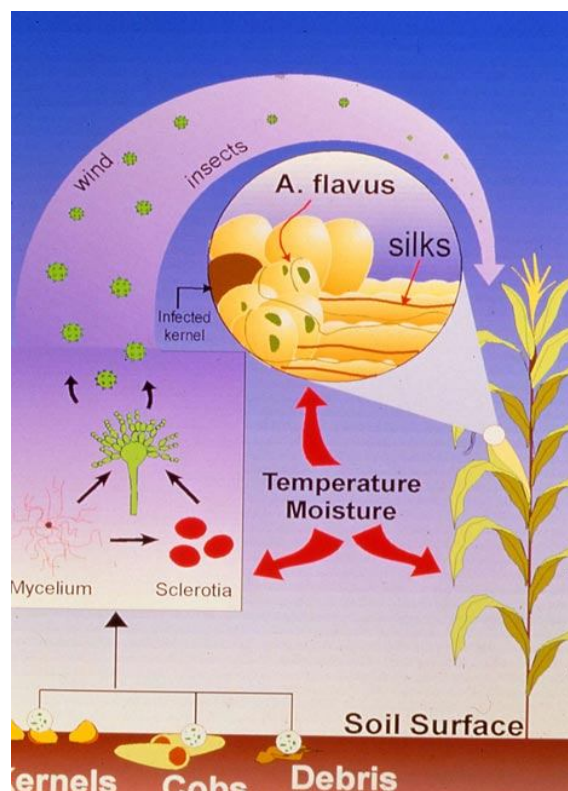
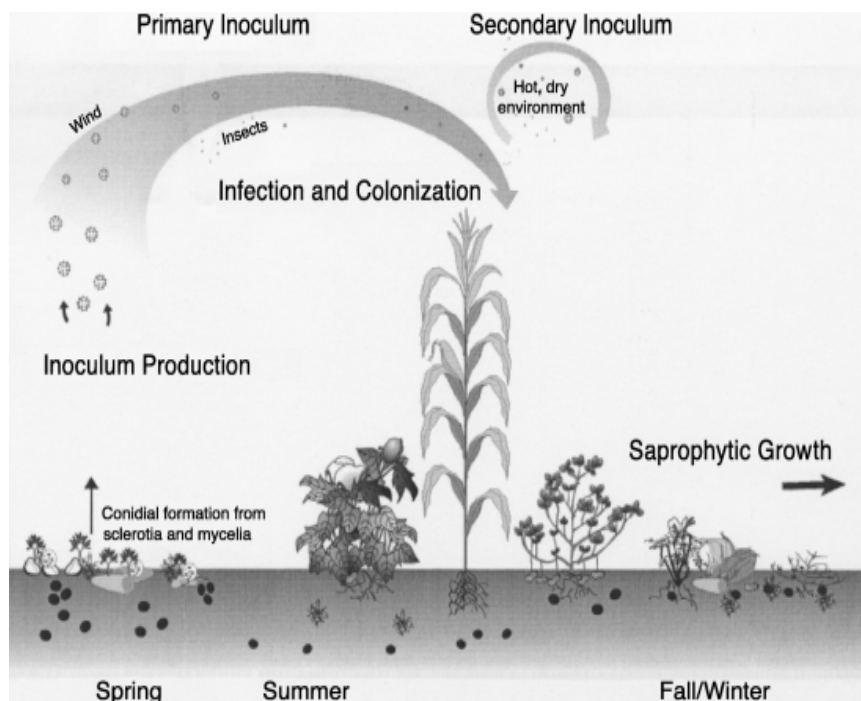
شکل ۱-۲: طبقه بندی قارچ ها (مرتضوی و همکاران, ۱۳۸۴)



شکل ۱-۱-۳: کپک پنی سلیم و فتومیکروگراف آن (مرتضوی و همکاران^a، ۱۳۸۴)

۲-۵-۱-۱: جنس اسپرژیلوس (*Aspergillus*):

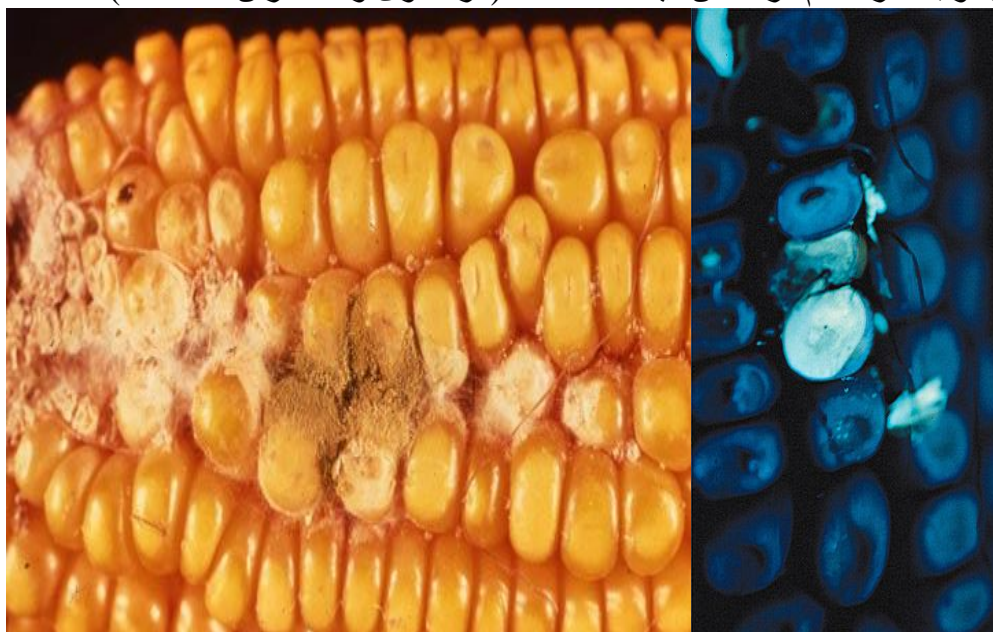
۱-۲-۵-۱-۱: خصوصیات عمومی: این قارچ نیز مثل پنی سلیم، جزو کپک های ناقص (Imperfect Fungi)، از رده دیوترومیست ها (Deutromycetes) و راسته مونیلیالس (Moniliales) و خانواده مونیلیاسه (Moniliaceae) می باشند (شکل شماره ۱-۱-۵).
بر اساس آخرین مطالعات این جنس شامل ۱۸۰ گونه با حدود ۷۰ مرحله جنسی نامگذاری شده است و در طبیعت به طور بسیار وسیعی پراکنده اند. دامنه انتشار گونه های مختلف این جنس را از نواحی قطبی گرفته تا مناطق حاره می توان پیدا نمود. کنیدی های این قارچ ها در هوا، خاک و در هر کجای دیگر یافت می شوند. قارچ های اسپرژیلوس قادرند بر روی تعداد زیادی از محیط های غذایی نشو و نما کنند که به علت ترشح آنزیم های مختلف توسط این قارچ می باشد (جداول ۱-۱-۲ و ۱-۱-۳ و شکل های ۱-۱-۴ و ۱-۱-۵). به گونه ای که بیش از ۱۰۰ محیط کشت سنتتیک و نیمه سنتتیک برای آن به کار می رود. بعضی از گونه های این قارچ می توانند حتی بر روی چرم های کهنه و منسوجات نیز رشد و تکثیر نموده و باعث کاهش ارزش تجارتي آنها شوند. ضمن اینکه بوی گندیدگی خاصی در کفش ها و یا پارچه ها به وجود می آید. بسیاری از گونه های این جنس از نظر صنعتی حائز اهمیت هستند و در زندگی انسان ها نقش مهمی را ایفاء می نمایند.



شکل ۱-۱-۴ : دیاگرام های آلودگی توسط آسپرژیلوس و عوامل مؤثر بر آن (تصاویر از اینترنت اخذ شده اند)

قارچ های آسپرژیلوس دسته گلاکوس (*glaucus*) که ایجاد کنیدی های سبزرنگی می نمایند، دارای خاصیت اسموفیلی هستند و بیشتر موجب فساد مواد غذایی که درصد مواد قندی و یا نمکی آن ها زیاد است، می شوند. آسپرژیلوس نیجر (*A.niger*) که معمولاً کپک سیاه نیز نامیده می شوند، بر روی انجیر، خرما، غوزه پنبه و بسیاری فرآورده های گیاهی دیگر یافت می شوند. گونه های به خصوصی

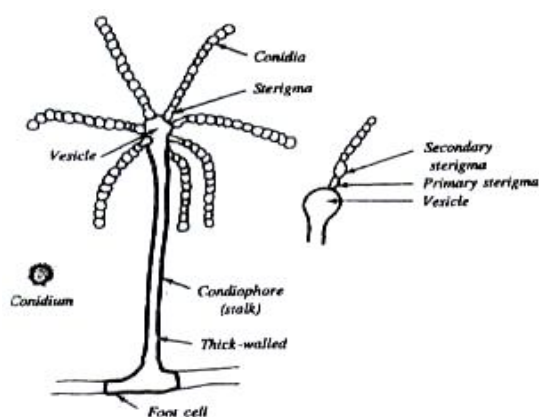
از گروه قارچ های آسپرژیلوس نیجر برای تهیه اسید سیتریک، اسید گلوکونیک و یا تهیه آنزیم های مختلف به ویژه آمیلاز، پروتئیناز، پکتیناز و یا لیپاز مورد استفاده قرار می گیرند. در کشورهای آسیای شرقی به ویژه در ژاپن، برای تخمیر انواع غذاهای مختلف تخمیری و برای تهیه یک نوع الکل آشامیدنی از برنج، قارچ آسپرژیلوس اوریزه (*A. oryzae*) به کار برده می شود و یا در بعضی از کشورهای آسیایی در عملیات روغن کشی از دانه های سویا، از قارچ آسپرژیلوس اوریزه همراه با آسپرژیلوس ونتی (*A. wentii*) استفاده می کنند. زیرا خاصیت پروتئولیتیکی این قارچ بسیار عالی است. آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) و بعضی دیگر از گونه های این جنس پاتوژن های حیوانی و انسانی هستند و در اثر حمله آن ها بیماری مخصوصی به نام آسپرژیلوزیس (Aspergillosis) در انسان و حیوان شیوع پیدا می کند. هر چند که بیماری آسپرژیلوزیس بیشتر در پرندگان بروز کرده و موجب عفونت ریه ها می گردد، ولی این بیماری در حیوانات دیگر مانند گوسفند، اسب و به ندرت هم در انسان دیده شده است. (مرتضوی و همکاران^a، ۱۳۸۴)



شکل ۱-۵: آلودگی ذرت توسط قارچ آسپرژیلوس و نمایش آلودگی توسط اشعه ماورای بنفش (طرف راست) (تصاویر از اینترنت اخذ شده اند)

۱-۵-۲-۲-۱-۱: شناسایی: آسپرژیلوس ها دارای میسلیم بی رنگ و غیر شفاف بوده و واجد دیواره عرضی هستند و به خوبی هم منشعب می شوند و سلول های آنها مطابق معمول چند هسته ای هستند. بر روی میسلیم تعداد زیادی کنیدیوفورهای طویل راستی به وجود می آیند که در انتهای هر کدام برآمدگی کروی یا بیضوی شکلی به صورت حباب درآمده و به آن ها ویسل اطلاق می شود. این کنیدیوفورها منفرد بر روی هیف ها تشکیل می شوند. سلول هیفی را که ایجاد کنیدیوفور می نماید سلول پایه می نامند. بر روی سطح خارجی ویسل تعداد زیادی زائده به نام استریگما به وجود می آید و بسته به انواع مختلف جنس آسپرژیلوس ممکن است که یک یا دو طبقه استریگما تشکیل شود، که به ترتیب استریگمای طبقه اول را استریگمای اولیه و طبقه دوم را استریگمای ثانویه نامگذاری کرده اند. بعد از ایجاد دولایه استریگما، کنیدی ها بر روی استریگمای لایه دوم به وجود می آیند. شکل استریگماهایی که کنیدی بر روی آن ها قرار دارد، اعم از اینکه بر یک یا دولایه باشد، بطری مانند است. بعد از آن که استریگماها به حداکثر رشد نهایی خود رسیدند، کنیدی به ترتیب یکی پس از دیگری به صورت زنجیر بر روی استریگما به وجود می آیند. کنیدی ها معمولاً کروی شکل تک سلولی و دارای دیواره خارجی صاف یا زبر و خشن هستند. کنیدی آسپرژیلوس در داخل رأس استریگما که در واقع لوله ای شکل است، تشکیل می گردد و به این صورت که مقداری از پروتوپلاسم با یک هسته در رأس

استریگما قرار می گیرد و با ایجاد یک دیواره عرضی در حالی که به استریگما وصل است، به حالت یک واحد مستقل درمی آید. در این حالت پروتوپلاسم به شکل کروی درآمده و دیواره ای در اطراف خود ترشح می کند و بدین ترتیب کنیدی به وجود می آید. در حین تشکیل اولین کنیدی، پروتوپلاسم دوم که در زیر کنیدی اول قرار دارد، تبدیل به اسپور می گردد و برای خروج به کنیدی قبلی فشار می آورد و بدون آنکه از روی کنیدیفور جدا شود، آن را به جلو هدایت می کند و در نتیجه به این صورت زنجیری از کنیدی بر روی استریگما تشکیل می گردد (مرتضوی و همکاران^a، ۱۳۸۴) (تصویر ۱-۴).

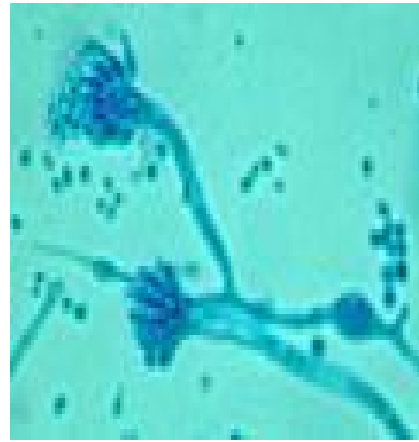
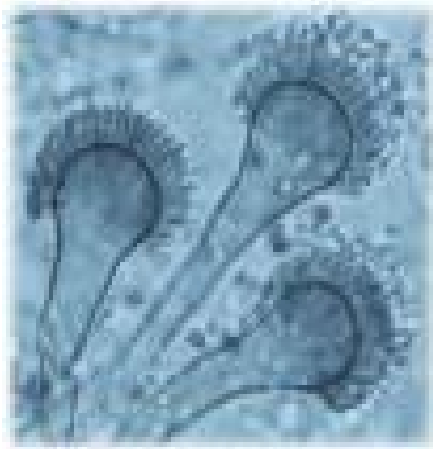


شکل ۱-۴: فتومیکروگراف و شکل سلول پایه، کنیدیفور، استریگماها و کنیدی در *آسپرژیلوس* (مرتضوی و همکاران^b، ۱۳۸۴)

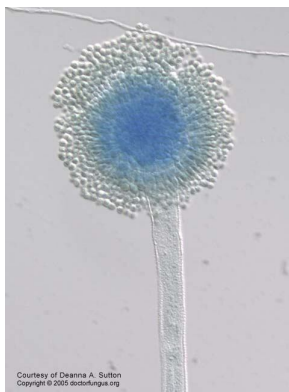
رنگ پرگنه *آسپرژیلوس* ها بر حسب گونه قارچ و نوع محیط کشت متفاوت است. از سیاه تا قهوه ای ، زرد و سبز متغیر است. وجود ماده رنگی در قارچ های *آسپرژیلوس* مربوط به حضور عناصر کم مصرف در محیط کشت قارچ می باشد. برای مثال در بین گونه های مختلف، جنس *آسپرژیلوس* نیجر نسبت به مختصر مس حساسیت دارد و به همین علت از این قارچ برای اندازه گیری عنصر مس در خاک یا مواد دیگری که مقدار مس آن ها بسیار کم بوده و به طریقه شیمیایی قابل سنجش نیست، استفاده می شود. آزمایش های انجام شده، نشان می دهد که برای تشکیل رنگ سیاه در گونه *آسپرژیلوس* نیجر حدود ۲/۵ میلیون گرم عنصر مس مورد نیاز است. در صورتیکه مقدار مس از این مقدار کمتر باشد، رنگ کنیدی ها به صورت روشن در می آید. تا جایی که حتی اگر در محیطی به کلی مس نباشد، رنگ کنیدی ها که معمولاً قهوه ای و یا سیاه هستند، به رنگ زرد در می آید. (در شکل های ۱-۱ تا ۱-۷ تا ۱-۱۱ تصاویر میکروسکوپ نوری و شکل پرگنه های تعدادی از قارچ ها نشان داده شده است).



شکل ۱-۷: تصاویر میکروسکوپ نوری، طرف راست: *Aspergillus nidulans* و طرف چپ: *Aspergillus clavatus* (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)



شکل ۱-۸: تصاویر میکروسکوپ نوری، طرف راست: *Aspergillus glaucus* و طرف چپ: *Aspergillus fumigatus* (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)



شکل ۱-۹: تصاویر میکروسکوپ نوری، طرف راست: *Aspergillus parasiticus* و وسط: *Aspergillus niger* و طرف چپ: *Aspergillus flavus* (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)

در میان دستجات مهم اسپرژیلوس، دسته فلاووس (*flavus*) توکسین زا هستند و مهمترین گونه های آن عبارتند از اسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) و آ. پارازایتیکوس (*A. parasiticus*). که هر دو آفاتوکسین می سازند که در ذیل به ویژگی های آنها اشاره می شود.

۱-۵-۲-۳: اسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازایتیکوس:

اسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازایتیکوس توسط ریپر و فنل (۱۹۶۵) در گروهی رده بندی شدند که اصطلاح «گروه اسپرژیلوس فلاووس» به آن داده شد، و این واژه گزینی ناصحیح بود که اکنون به جای آن، اصطلاح «اسپرژیلوس دسته فلاووس ها» به کار می رود. این دو گونه رابطه تنگاتنگی با گونه های آ. اوریزه و آ. سوگا دارند که در تولید و ساخت غذاهای تخمیری در آسیا حائز اهمیتند. لیکن آفاتوکسین را تولید نمی کنند، به دلایلی واضح افتراق صحیح این چهار گونه مهم می باشد.

افتراق آ. فلاووس و آ. پارازایتیکوس از تقریباً تمامی گونه های دیگر دشوار نیست. هر دوی آنها به سرعت بر روی محیط های کشت شناسایی استاندارد نظیر چاپکس آگار (Czapek) یا عصاره مالت آگار (MEA) یا عصاره مخمر چاپکس (CYA) رشد کرده و کونیدی های سبز مایل به زرد (مغز پسته ای) بر روی کلنی ها ایجاد می کنند که در غیر این صورت بی رنگند. تشخیص آ. فلاووس از آ. پارازایتیکوس دشوارتر است. ضمن آنکه عدم توافقی در میان مطالعه کنندگان این گونه ها وجود دارد. آخرین بررسی ها به این نکته اشاره دارد که بافت دیواره های کونیدی ها قابل اتکاترین خصیصه افتراقی است. دیواره های کونیدی های آ. فلاووس معمولاً صافند یا ناهمواری و زبری خفیفی دارند، در حالی که دیواره های آ. پارازایتیکوس مشخصاً هنگامی که با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر عدسی شیئی

نگریسته می شوند، زبر و ناهموارند (شکل ۱-۱-۹). انواع گوناگونی از خصوصیات دیگر از ارزش رده بندی علمی برخوردارند. از طرفی آ. فلاووس معمولاً آفاتوکسین B می سازند، و کمتر از ۵۰٪ آنها توکسین می سازند. در حالی که آ. پارازایتیکوس آفاتوکسین G و همچنین B می سازند و به طور لایتغیر توکسین سازند. (مرتضوی ، ۱۳۸۴)

برخی محیط های کشت ویژه برای شناخت سریع آسپرژیلوس های بالقوه آفاتوکسین ساز، مورد استفاده قرار می گیرند. جهت تجسس و کشف آ. فلاووس و آ. پارازایتیکوس در ظرف ۳ روز، «محیط افتراقی آسپرژیلوس» و یا «آسپرژیلوس فلاووس و پارازایتیکوس آگار» (AFPA) را می توان مورد استفاده قرار داد. یک محیط کشت دیگر که حاوی آنتی بیوتیک بلئومایسین است به تشخیص آ. پارازایتیکوس از آ. سوجا کمک می کند. بر روی این محیط ، رشد هر دو نوع تا حدودی کاهش می یابد. لیکن آ. سوجا کلنی های بسیار محدودی ایجاد می کند، در حالی که قطر کلنی های آ. پارازایتیکوس در ظرف ۶ روز حداقل ۳ میلی متر خواهد شد. این محیط های انتخابی به ویژه برای تجسس و کشف سریع توکسین سازهای قارچی در کالاهای غذایی مناسب می باشند. خصوصیات متمایز کننده آسپرژیلوس فلاووس و انواع مرتبط در جدول ذیل (جدول ۱-۱-۴) مشخص شده است. (مرتضوی ، ۱۳۸۴)

جدول ۱-۱-۲ : وقوع آسپرژیلوس در تعدادی محصولات کشاورزی در کشورهای مختلف جهان (Ruston , 1997)

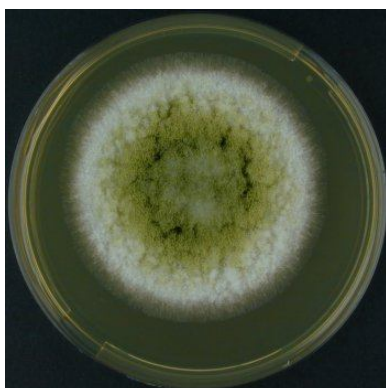
Commodity	Country	Species
Peanuts	Sudan	<i>A. flavus</i>
	Egypt	<i>A. flavus</i> + <i>A. niger</i>
	S. Africa	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
Maize	India	<i>A. flavus</i>
	China	<i>A. flavus</i>
	Uganda	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
	Nigeria	<i>A. flavus</i> + <i>A. p.</i> + <i>A. niger</i>
	USA	<i>A. flavus</i>
Wheat	China	<i>A. flavus</i>
	Russia	<i>A. flavus</i>
Rice	China	<i>A. flavus</i>
	India	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
Millet	India	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
Soybean	Argentina	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
Sunflower oil	China	<i>A. flavus</i>
	Russia	<i>A. flavus</i>
Coconut	India	<i>A. flavus</i>
Pistachio	USA	<i>A. niger</i> + <i>A. flavus</i> + <i>A.p.</i>
	Turkey	<i>A. flavus</i>
Figs	Switzerland	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
Mustard seed	India	<i>A. flavus</i>

جدول ۱-۳: وقوع آفاتوکسین ها در بعضی از مواد غذایی (Ruston , 1997)

Food	Country	Contami-nated/total ex-aminated	Aflatoxin	Concentration (? g kg ⁻¹)
Rice	China	33/ 252	B ₁	5-50
	India	1/1	B ₁	20
Maize	Kenya	70/78	— ^a	30-920
	Usa	2370/2633	—	10-700
	Mexico	86/96	—	2.5-30
	Brazil	40/328	B ₁	>20
	Denmark	6/197	Total ^b	5-174
	France	3/3	B ₁	20
	India	47%	B ₁	>20
Sorghum	S. Africa	—	B ₁	0-25
	India	—	B ₁	7-75
Copra	Tonga island	1/2	B ₁	37
Soybeans	India	49/75	B ₁	17-2110
	Usa	11/11	B ₁	<20
		3/24	B ₁	<6
	Argentina	9/94	B ₁	1-36
Oat, barely and wheat	Sweden	20/116	B ₁	50-400
Meat	Egypt	9/150	B ₁ , B ₂	4-15, 2-25
Dried figs	UK	8/93	Total	10-40
	Sweden	16/27	—	5-67
Potato	Fiji island	7/20	B ₁	6-12
Linseed	India	46/105	B ₁	120-810
Bakery products	Spain	1/50	B ₁ , G ₁	67, 46
Cottonseed	Argentina	5/5	B ₁	20-200
Sunflower	Spain	1/1	B ₁	20
Mustard seed	India	44/100	—	75
Milk	Sweden	19/267	M ₁	>0.05
	Spain	14/47	M ₁	20-100
Human milk	Abu Dhabi	443/445	M ₁	0.002-3.0

^a —, not mentio

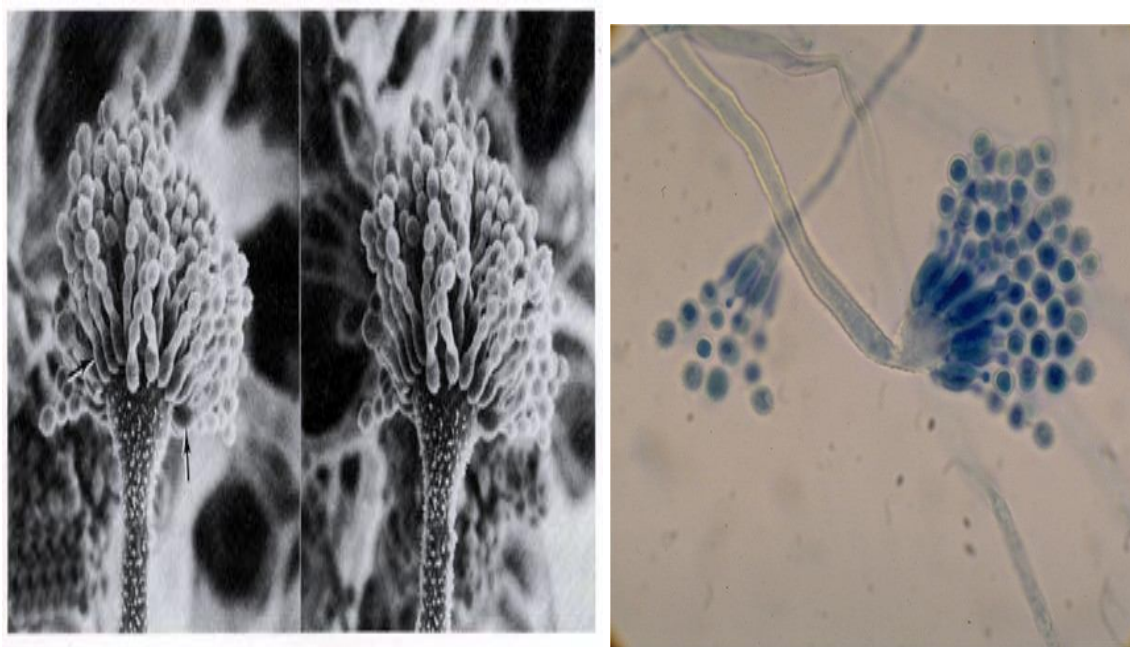
^b B₁ + G₁ + B₂ + G



شکل ۱-۱۰: کلنی های آسپرژیلوس فلاووس بر محیط کشت MEA (تصاویر از اینترنت گرفته شده است)

جدول ۱-۱-۴ : خصوصیات متمایز کننده چند گونه از اسپرژیلوس ها

گونه ها	رنگ کلنی	کنیدی ها	آ. فلاوس و آ. پارازایتیکوس آگار	آفلاتوکسین های B ₂ و B ₁	آفلاتوکسین های G ₂ و G ₁
آ. فلاوس	سبز	دیواره	نارنجی	++	-
آ. پارازایتیکوس	سبز مایل به زرد	صاف	نارنجی	++	++
آ. نومیوس	تیره	زبر	نارنجی	++	++
آ. اوریزه	سبز	مشخص	کرم	-	-
آ. سوجا	قهوه ای	زبر	نارنجی	-	-
آ. تاماریای	قهوه ای کم رنگ قهوه ای تیره	مشخص دیواره صاف زبر مشخص زبر مشخص	قهوه ای	-	-



شکل ۱-۱-۱۱ : تصویر میکروسکوپ نوری (عدسی ۱۰۰ شیئی) و فتومیکروگراف اسپرژیلوس فلاوس (تصاویر از اینترنت گرفته شده است)

بخش دوم :

۲-۱ : نقش مایکوتوکسین ها در بیماری های انسان و دام :

۱-۲-۱ : جنبه های عمومی :

ارتباط بین نوع قارچ در مواد غذایی انسان یا حیوان و ایجاد بیماری از مدت ها قبل شناخته شده است. ولی خطرات عمده بهداشتی غذاهای حاوی مایکوتوکسین ها تا شروع پرورش مدرن حیوانات به طور متراکم آشکار نبود. اکنون اهمیت دامپزشکی مایکوتوکسین ها به میزان زیادی شناخته شده است. به ویژه با توجه به این نکته که حتی مقادیر بسیار کمی از مایکوتوکسین ها می تواند سلامت انسان را متأثر ساخته و باعث ضررهای اقتصادی عمده ای بشود. با اینکه مایکوتوکسین ها قادرند که سلامت بسیاری از گونه های حیوانی را متأثر سازند ولی اثرات آن ها در سیستم های پرورش متراکم حیوانات اهلی از قبیل گاو شیری، گاو گوشتی، طیور، خوک و ماهیان به این دلیل که تغذیه نرمال آنها با دریافت میزان بالایی از کنستانتتره صورت می گیرد، اختصاصاً مورد توجه قرار گرفته است.

در گذشته، مایکوتوکسین ها مسؤول اپیدمی های عمده ای از مسمومیت انسان و حیوانات بوده اند که مهمترین آنها عبارتند از :

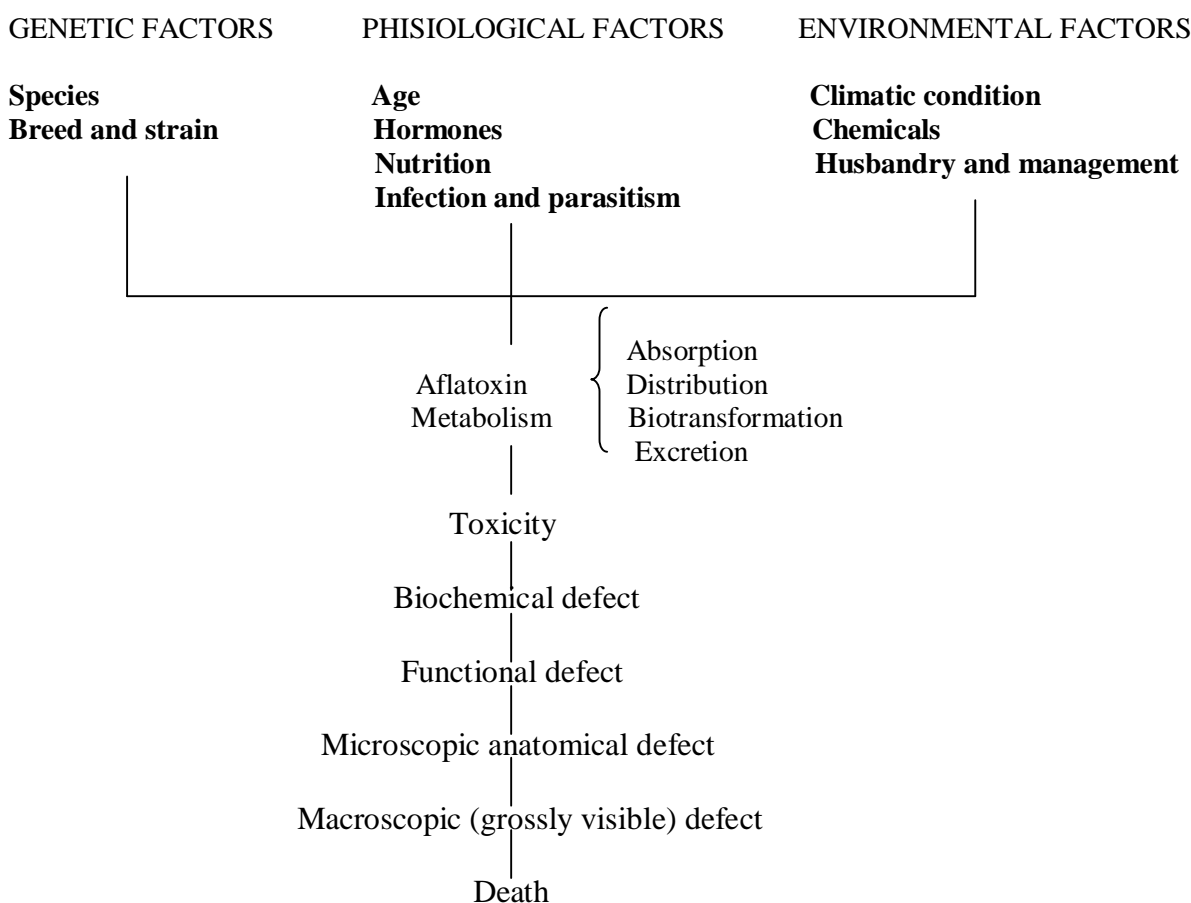
- ۱- ارگوتیسم (Ergotism) که در هزاره اخیر تعداد بیشماری از مردم اروپا را تلف کرد،
 - ۲- آلوکای سمی دستگاه گوارش (Alimentary toxic aleukia) که مسؤول مرگ حداقل صد هزار نفر از مردم روسیه در دهه ۱۹۴۰ بوده است،
 - ۳- استاچی بوتریوتوکسیکوزیس که ده ها هزار اسب را در دهه ۱۹۳۰ در شوروی سابق به کام مرگ فرستاد،
 - ۴- آفاتوکسیکوزیس که نه تنها مسؤول مرگ بوقلمون های جوان در انگلستان در ۱۹۶۰ بود، بلکه باعث مرگ یا بیمار شدن بسیاری از حیوانات از جمله ماهیان پرورشی و انسان ها بوده است.
- در معرض قرار گرفتن با اسپورهای قارچی به ویژه اسپورهای موجود در مناطق هوایی سیلوها ممکن است باعث مایکوتوکسیکوزیس ریوی شود و در همین ارتباط اهمیت پرهیز از استنشاق اسپورهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آ. پارازایتیکوس* مشخص گردید. نشان داده شده است که اسپور کپک های مولد توکسین حاوی غلظت های بالایی از مخلوط مایکوتوکسین های تولیدشده توسط گونه های قارچی هستند. تعدادی از مطالعات انجام شده در این رابطه نشان دهنده افزایش خطر سرطان کبد ناشی از استنشاق اسپورها و گرد و غبار حاوی آفاتوکسین است. نتایج مطالعات بر روی ۴۱۰۰ کودک از ۶ شهر شمال شرقی آمریکا و ۱۵۰۰۰ کودک از ۳۰ جمعیت در کانادا که از نظر سلامت دستگاه تنفسی بررسی می شدند، حاکی از آن است که بین علایم تنفسی که داشتند و وجود کپک به انضمام رطوبت موجود در خانه های آنها ارتباطی حاکم است. ولی یافته ها نشان می دهد، که در این مورد یک مکانیسم غیرآلرژیک درگیر است. همینطور ترکیبات فرار تولیدی توسط کپک ها از جمله *پسیلومایسس واریوتی* (*Paecilomyces varioti*) بر روی سلامتی افراد تأثیر سوء دارند. ولی نقش آن ها در اثرات سوء بر روی سلامتی افراد، بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک مبهم می باشد. به هر حال آنها می توانند باعث تحریک چشم، بینی و گلو شده و ایجاد سردرد و خستگی بنمایند. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳، توتونچیان، ۱۳۸۱)

از طرف دیگر در مناطقی از آفریقا که سرطان کبدی شیوع بالایی دارد، وجود آفاتوکسین فوزاریوم در غذاهای غله ای و همچنین در بافت های حیوانی و فراورده های آن، مثل شیر، شناسایی شده است که با مصرف آنها توسط افراد آن مناطق، مایکوتوکسین ها به بدن انسان راه می یابد. علاوه بر نکات فوق در ارتباط با اهمیت مایکوتوکسین ها در بهداشت انسان و حیوان، قابل ذکر است که دخالت احتمالی مایکوتوکسین ها در بسیاری از اپیدمی ها و از جمله باران زرد در لائوس گزارش شده است. اخیراً در خلال جنگ های اخیر خلیج فارس، استفاده از مایکوتوکسین ها به عنوان سلاح های بیولوژیکی (Biological weapons) مطرح شد و اگرچه گواه مستدلی در این رابطه ارائه نشد، ولی

تبلیغات بالا بود و مطالعات انجام یافته در آلمان نشان می دهد که مایکوتوکسین های T-2 ، وروکولوژن (Verrucologen) و ساتراتوکسین (Satratoxin) به عنوان سلاح های بیولوژیکی قوی قلمداد می شوند.

اصولاً هر مایکوتوکسین ممکن است بیش از یک سیستم بدنی را متأثر سازد، و حیوانات هم می توانند نمایانگر حساسیت های متغیری نسبت به مایکوتوکسین ها بر اساس فاکتورهای ژنتیکی (گونه، نژاد و سویه)، فاکتورهای فیزیولوژیکی (سن، تغذیه و سایر بیماریها) و فاکتورهای محیطی (شرایط آب و هوایی، نگهداری، مدیریت و ...) باشند. (شکل ۱-۲-۱)

مایکوتوکسین ها تعدادی از بافت ها و ارگان ها را متأثر می سازند، اما برای هر مایکوتوکسین یک ارگان یا بافت هدف اصلی وجود دارد. این حقیقت که سیستم ایمنی ارگان هدف چند مایکوتوکسین می باشد، حاکی از این است که متعاقب مایکوتوکسیکوزیس های اولیه ممکن است بیماری های عفونی ویروسی، باکتریایی، قارچی یا انگلی رخ بدهد. در سطح بیولوژی مولکولی، مایکوتوکسین ها ممکن است با تولید انرژی، در سنتز پروتئین یا ساخته شدن اسکلت سلولی تداخل کنند. همان طور برخی از آنها مثل آفلاتوکسین ها، استریگماتوسیسستین، اوکراتوکسین A و... می توانند علاوه بر دارا بودن خواص سمی به عنوان کارسینوژن هم مطرح باشند. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)



شکل ۱-۲-۱ : بازنمایی ساده شده روابط در آفلاتوکسیکوزیس

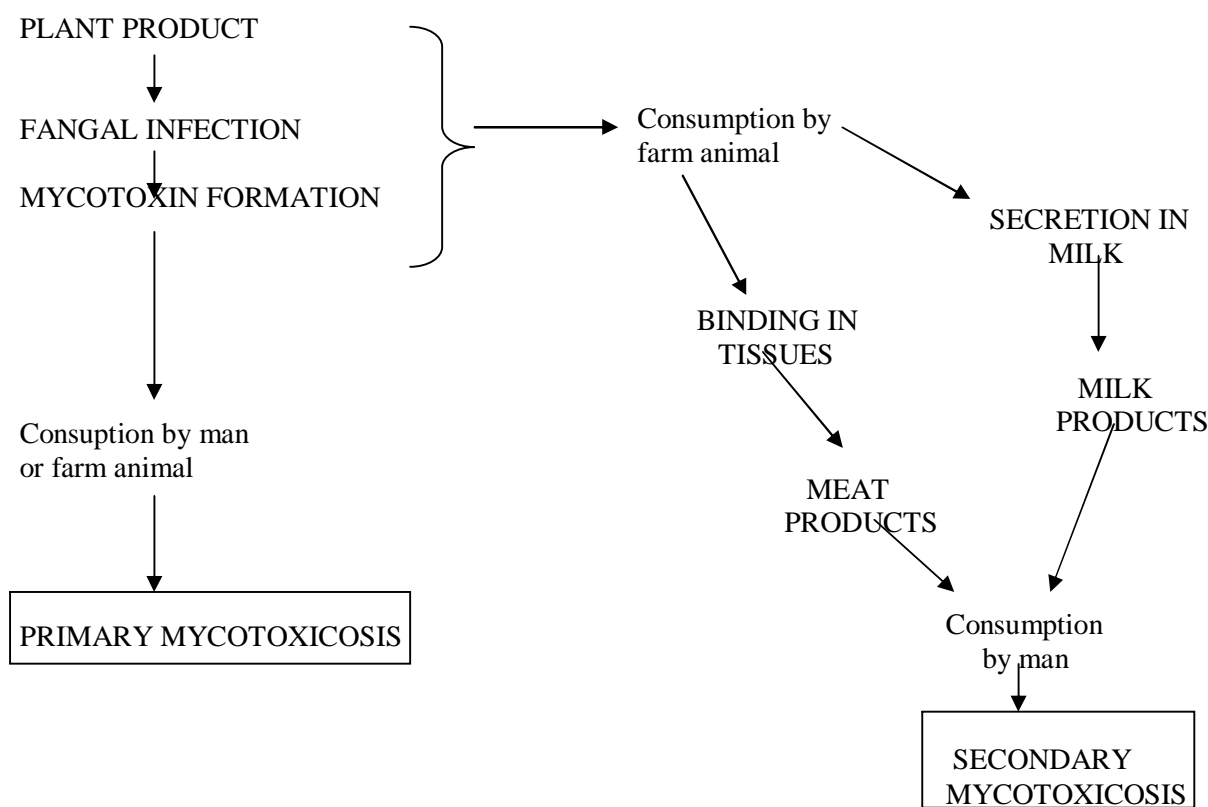
علاوه بر ضایعات مجزا در بافت های اصلی و غیراصلی، مطالعات طولانی مدت در حیوانات پرورشی (Farm animals) نشان داده است، که کاهش میزان رشد و افزایش مصرف غذا که از فاکتورهای مهم اقتصادی در نگهداری حیوانات هستند از پدیده های توأم با در معرض قرار گرفتن با

مایکوتوکسین ها می باشند. مشخص شده است که مشکلات ناشی از مایکوتوکسین ها عمدتاً از در معرض قرار گرفتن دستگاه گوارشی با مواد غذایی آلوده به آن ها حاصل می شود. ولی دخالت سایر روش ها از قبیل تماس با اسپورها و قطعات میسلیمی حاوی مایکوتوکسین از طریق هوا نیز منتفی نمی باشد. (شکل ۲-۲-۱)

۲-۲-۱ : جنبه های اختصاصی :

به طور کلی اثر مایکوتوکسین ها بر روی حیوانات و از جمله ماهیان، در ۳ شکل قابل مجزایی گروه بندی شده است که در انسان نیز قابل تعمیم است، شامل :

- ۱- مایکوتوکسیکوزیس حاد اولیه (Acute primary mycotoxicosis)
- ۲- مایکوتوکسیکوزیس مزمن اولیه (Chronic primary mycotoxicosis)
- ۳- بیماری ثانویه مایکوتوکسینی (Secondary mycotoxin diseases) (شکل ۲-۲-۱)



شکل ۲-۲-۱ : مایکوتوکسیکوزیس اولیه و ثانویه

۱-۲-۲-۱ : مایکوتوکسیکوز حاد اولیه :

مایکوتوکسیکوز حاد باعث علایم بالینی متفاوتی می شود، که بستگی به طبیعت و غلظت توکسین دارد. این اثرات هنگامی که غلظت های بالا تا متوسطی از مایکوتوکسین مصرف شده باشد، ایجاد می شود و در این رابطه توکسین های خاص، اندام ها یا بافت های خاصی از قبیل کبد، کلیه، دهان و مخاط معده، مغز یا دستگاه تولیدمثل را متأثر می سازند و باعث سندرم حادی از جمله هیپاتیت، هموراژی، نفریت، نکروزای تلیوم دهان و روده و نیز مرگ می شوند.

در مایکوتوکسیکوزهای حاد، علایم بیماری اغلب مشخص هستند و مستقیماً به ارگان های هدف تحت تأثیر قابل ارجاع می باشند. ولی این علایم در کل شامل طیش قلب، تاکی پنه، ریزش بزاق، ریزش

اشک، استفراغ، اسهال، زردی، ادم، ترمور، تشنج، خونریزی، اختلال حسی، فلجی و مرگ ناگهانی می شود.

یک ماده زمانی که یک دز منفرد بالا یا یک سری دزهای کم آن سبب مرگ شود، می تواند برای حیوان سمی در نظر گرفته شود. مقادیری از توکسین در زیر حد LD₅₀ آن، درجات متغیری از بیماری و اختلال مزمن فونکسیونل را در حیوان باعث می شود. مقادیر LD₅₀ با جنس، سن، سویه حیوان، روش های تجویز (خوراکی از طریق دهان یا لوله مری، تزریقی داخل وریدی یا داخل صفاقی)، حلال های سموم، حضور سایر میکوتوکسین ها، ترکیب غذا و ... تحت تأثیر قرار می گیرد. مطالعات پاتولوژیکی نشان داده است که در سطوح حاد میکوتوکسین ها، تمام سیستم های بدن حیوان توسط یک یا ترکیبی از میکوتوکسین ها می تواند متأثر گردد که عبارتند از :

- ۱- سیستم عروقی : افزایش شکنندگی عروق، خونریزی در داخل بافت های بدن (آفاتوکسین ، دی کومارین)،
 - ۲- سیستم گوارشی : اسهال، خونریزی روده و اثرات سمی بر روی کبد که باعث نکروز کبد می شود، پرولیفراسیون و فیبروز مجرای صفراوی (آفاتوکسین) اثرات سوزاننده بر روی غشاهای مخاطی (توکسین T-2)، انسداد مجاری صفراوی (اسپوری دسمین : Sporidesmin)، برگرداندن غذا (ومیتوکسین : Vomitoxin)،
 - ۳- سیستم تنفسی : آدنوماتوز (۴- ایپومنول : 4-Ipomenol)،
 - ۴- سیستم عصبی : ترمور، عدم تعادل، جنون، کما، (ترمورژنها، ارگوتامین و آکالوئیدهای وابسته)،
 - ۵- سیستم جلدی : حساسیت به نور (اسپوری دسمین)، نکروز و پوست انداختن انتهای بدن (ارگوت)
 - ۶- سیستم ادراری : نفروز، اورمی (اوکراتوکسین و سیتترین : Citrinin) و
 - ۷- سیستم تناسلی : عقیمی، استروس طولانی (زراننون و توکسین T-2)
- قابل ذکر آنکه تمام اثرات پاتولوژیک میکوتوکسین ها، همان طور که در کاربرد آزمایشگاهی آن ها مشاهده شده، در شکل رخداد طبیعی آن ها هم مشاهده شده است. ولی از طرف دیگر اکنون معلوم شده است که بیشتر آلودگی های میکوتوکسینی غذاها و یا آلودگی های مراکز پرورشی حیوانات و از جمله ماهیان، با علایم میکوتوکسیکوزیس مزمن یا بیماری های ثانویه میکوتوکسینی همراه است. چون در غالب موارد، غلظت میکوتوکسین غذاهای حیوانی کمتر از میزانی است که باعث بیماری حاد شود و در غلظت های کمتر، اثرات آن ها بسیار متغیر است.
- در میان میکوتوکسین های شناخته شده، میکوتوکسین هایی که به ویژه مسؤول مسمومیت حاد می باشند، عبارتند از : آفاتوکسین ها، تریکوتسن ها (دی استوکسی سیرپنول، توکسین T-2 و د- اکسی نیوالنول)، اوکراتوکسین A و زراننون. گاهی سایر میکوتوکسین ها ممکن است در این رابطه نقش داشته باشند، مثل آکالوئیدهای ارگوت، وروکارین ها، روریدین ها (Roridines) و ساتراتوکسین ها (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳).

۱-۲-۲ : میکوتوکسیکوز مزمن اولیه :

در حال حاضر به نظر می رسد که میکوتوکسیکوز مزمن به عنوان یک معضل مهم در دامپزشکی می باشد. در این نوع از بیماری ها غلظت کافی از میکوتوکسین ها در غذا که باعث میکوتوکسیکوزیس حاد با علایم اختصاصی شود، یافت نمی شود و لذا تغییرات قابل رؤیت ماکروسکوپی در مبتلایان وجود نداشته و به همین دلیل تشخیص آن ها از روی علایم بسیار مشکل می شود.

در اغلب موارد تنها شواهد موجود، افت تولید و از دست رفتن وزن، باروری معیوب و ناقص یا افزایش حساسیت به بیماری است. در این موارد، آزمایش غذا غالباً نمایانگر وجود میکوتوکسین

خواهد بود. یک مسئله ویژه، عمل ایمونوساپرسیو مایکوتوکسین ها می باشد که در مورد آفلاتوکسین ها، اوکراتوکسین A، دی استوکسی سیرینول، توکسین T-2، فوزارنون X (Fusarenone X)، بوتنولید (Butenolide)، و همچنین عصاره های فوزاریوم پونه (*Fusarium poae*)، فاسپوروتری شیوئیدز (*F. sporotrichioides*) و استاچی بوتریس آلترنانس (*Stachybotrys alternans*) نشان داده شده است.

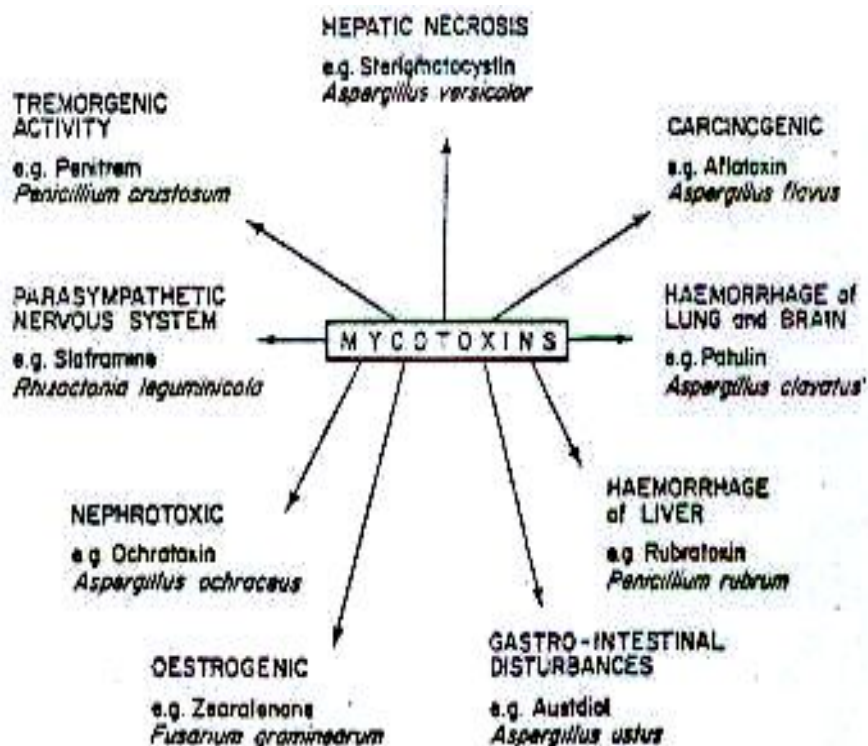
در مایکوتوکسیکوز مزمن گوساله، طیور و خوک، اثرات به صورت کاهش تولید در شکل کاهش رشد، کاهش کفایت تولید مثلی و کاهش کیفیت عرضه به بازار بروز می کند. کاهش کفایت تبدیل غذایی که منجر به کاهش وزن و نیز ضررهای اقتصادی در حیوانات می شود، با مصرف آفلاتوکسین ها، اوکراتوکسین A و توکسین T-2 دیده شده است. همین طور کاهش محصول شیر در گاوهای شیری، کاهش تولید تخم مرغ و افزایش تخم ترک دار در طیور بالغ در معرض آفلاتوکسین و اوکراتوکسین A وجود داشته است. توکسین T-2 می تواند تولید تخم مرغ را با اثر بر روی ضخامت و سفتی پوسته آن تحت تأثیر قرار دهد و یا آفلاتوکسین باعث از دست رفتن استحکام بافت شده که باعث افزایش حساسیت آن به تروما گردیده و در مرغ های پرورشی باعث کاهش کیفیت عرضه به بازار می گردد و قابل توجه آنکه همه این مسایل پس از کشتن آن ها جهت عرضه به بازار مشاهده شده است. در مورد مایکوتوکسیکوزیس های اولیه موارد شاخصی در دام و انسان وجود دارد که در ذیل با توجه به موضوع تحقیق که در خصوص آفلاتوکسین ها می باشد، در مورد آفلاتوکسیکوزیس و اثرات بیولوژیک آن در دام ها، آبزیان و انسان اشاره شده است.

۱-۲-۳: آفلاتوکسیکوزیس و اثرات بیولوژیک آفلاتوکسین ها در دام ها :

به طور کل اثرات بیولوژیکی آفلاتوکسین ها را می توان در ۴ گروه عمومی تقسیم بندی کرد که عبارتند از : ۱- آسیب حاد و مزمن کبدی، ۲- کاهش میزان رشد، ۳- ایجاد نقص ایمونولوژیک و مکانیسم های ذاتی دفاع بدن، ۴- اثرات کارسینوژنیک و تراژونیک.

در واقع اثرات سمی آفلاتوکسین ها وابسته به دوز آن، زمان و گونه آن سم دارد. بسته به گونه و سن دام، مقدار و مدت زمان در معرض قرار گیری با آفلاتوکسین، این سم می تواند سبب تومورزایی، مسمومیت مزمن یا بروز نشانه های فوق حاد گردد (اسمیت، ۱۳۷۷). سطوح آفلاتوکسین در غذا می تواند تا ۳/۵ppb برای همه آفلاتوکسین ها، ۲ ppb برای AFB₂ و ۱ ppb برای AFB₁ باشد. در گوسفند ۴ ppb باعث نارسایی حاد کبدی و مقدار ۲ ppb باعث افزایش میزان تنفس، افزایش دما به میزان ۱/۵ درجه سلسیوس و اسهال همراه با خون و موکوس می شود و در میزان ۰/۲ ppb باعث بی اشتها و اسهال می گردد. مقدار زیادی از آفلاتوکسین های خورده شده به همراه غذا در گاو به طور فیزیکی به محتویات شکمبه باند می شود و مقدار ۲ الی ۵ درصد آن به روده می رسد. سطح AFB₁ که بیش از ۱۰۰ ppb در غذا باشد می تواند باعث مسمومیت برای گاو شود. تمامی دام ها ممکن است توسط آفلاتوکسین مسموم شوند. از میان پستانداران خوک های ماده جوان و خوک های آبستن حساس ترین دام ها نسبت به آفلاتوکسین ها می باشند. پس از آن به ترتیب گوساله، اسب، خوک های پرواری، گاوهای بالغ و گوسفندان قرار دارند (اسمیت، ۱۳۷۷، Radostits et al., 2000).

لازم به ذکر است که آفلاتوکسین B₁ از نظر بیولوژیکی فعالترین مشتق آفلاتوکسینی شناخته شده است و تقریباً حدود ۲ برابر فعال تر از آفلاتوکسین های G₁ و M₁ است. آفلاتوکسین های B₂ و G₂ فعالیتی تقریباً ۴ و ۸ برابر کمتر از B₁ دارند.



شکل ۱-۲-۳: فنومن های توکسیک مرتبط به میکوتوکسین ها

اثرات مهم بیولوژیکی آفاتوکسین ها می توان از مهار پروتئین و RNA، آسیب رساندن به فعالیت های کبدی، خواص کارسینوژیک، مهار سیستم ایمنی، ناقص الخلقه زایی و ممانعت از سنتز چربی را نام برد. AFB₁ فعالیت بیولوژیکی در کبد داشته و فعالیت ترکیبات واسط را که باعث تحت تأثیر قرار گرفتن نوکلئوفیل های مختلف در سلول می شود و پیوند کووالانسی با DNA، RNA و پروتئین برقرار می کند، را افزایش می دهد. بعد از استفاده آزمایشی از AFB₁، نشانه هایی از تحت تأثیر قرار گرفتن سنتز پروتئین در سطح ترجمه ای که همراه با عدم تجمع پلی ریبوزوم ها در شبکه آندوپلاسمیک می باشد، به دست آمد. بیشتر پاسخ های ناشی از سم AFB₁ در حیوانات در نتیجه تغییر در متابولیسم لیپید و کربوهیدرات و تحت تأثیر قرار گرفتن تنفس میتوکندریایی می باشد (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶، Gary, 1996).

با توجه به اثرات بیولوژیکی آفاتوکسین ها و مشاهدات بالینی می توان این اثرات را در دو بخش تقسیم کرد: ۱- اثرات کوتاه مدت، ۲- اثرات بلند مدت:

این اثرات بستگی به سطح دوزاژ و تکرار در معرض قرار گیری با سم دارد. اثرات کوتاه مدت شامل مسمومیت حاد با شواهد بالینی، آسیب کبدی و نشانه های عصبی مانند آتاکسی و تشنج می باشد. مصرف طولانی مدت آفاتوکسین ها به مقدار حجم کم، احتمالاً باعث مسائل و مشکلات خطرناک تری نسبت به حالت حاد، در ایجاد و بروز آفاتوکسیکوزیس مزمن، کاهش قابلیت تبدیل مواد غذایی، کاهش و توقف اخذ وزن روزانه، کاهش تولید شیر روزانه در گاو شیری و افزایش استعداد ابتلا به عفونت ها در بیشتر گونه ها در مدت زمان دپرس سیستم ایمنی افزایش می یابد. عمده ترین ارگان هدف برای میکوتوکسین ها در همه گونه های حیوانی کبد می باشد که بسته به شدت و مدت زمان در معرض قرارگیری، ضایعات در کبد ممکن است با آماس حاد، همچنین با نکروز سلول های کبدی و احتباس صفرا در سیروز همراه باشد و نشانه های هاپرپلازی مجاری صفراوی را نشان می دهد. کاهش فعالیت کبدی و افزایش فعالیت آنزیم های سرم، نشان دهنده نکروز سلول های کبدی است که عموماً می تواند در نتیجه ایجاد آسیب کبدی توسط آفاتوکسین باشد. اثرات دیگر مانند اختلال در انعقاد خون،

زردی و خونریزی های سرریزی و موکوسی ممکن است رخ دهد. در دوزهای بالا مشکلات حاد کبدی و خونریزی های وسیع که باعث انعقاد خون و افزایش شکنندگی عروقی و در نهایت مرگ می شود، رخ می دهد. آسیب و تخریب کبدی در دوزهای ممکن است باعث تغییرات دژنراتیو در لوله های پروگزیمال کلیه نیز بشود. تیموس نیز همچنین تأثیر می پذیرد و AFB_1 موجب آپلازی قشر تیموس می شود و به سوزی دپرس کردن پاسخ های سلول های واسط هدایت می شود. ایمنی همورال مشاهده می شود که حداقل تأثیر را می پذیرد. اما سطح کمپلمان کاهش می یابد و کاهش فعالیت فاگوسیتی در حیواناتی که در آنها از آفلاتوکسین استفاده شده است، نیز گزارش شده است. گزارش شده است که حیوانات جوان نسبت به بالغین در برخی گونه ها استعداد بیشتری به مسمومیت با آفلاتوکسین دارند (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶، Quine et al., 1994). در یک مطالعه ارتباط بین آفلاتوکسین موجود در جیره گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان، با شیوع ورم پستان بررسی گردید. در این آزمایش آفلاتوکسین در جیره دام های سالم، فقط در ۲۰ درصد جیره ها یافت گردید. ولی در گروه دام های مبتلا به ورم پستان، در ۴۴ درصد نمونه ها آفلاتوکسین پیدا شد. این بررسی نشان میدهد که آفلاتوکسین ها با سرکوب ایمنی و کاهش مقاومت موجب گسترش ورم پستان می شوند (Singh et al., 1996). در مورد ایجاد سقط توسط آفلاتوکسین ها نیز مدارکی وجود دارد. در یک مورد بروز سه مورد سقط در یک گله گاومیش و گاو ۴۰ رأسی گزارش گردید. در این گله از بررسی میکروبی هیچ عاملی جدا نگردید، ولی در نمونه های غذایی AFB_1 جدا شد (Ramashkumar et al., 1988). گفته شده است که آفلاتوکسین ها می توانند به عنوان یکی از عوامل زمین گیری و مرگ ناگهانی مطرح باشند. Cockcroft در سال ۱۹۹۳ از یک گله ۸۰ رأسی گاو، ۴ مورد مرگ ناگهانی و یک مورد زمین گیری را گزارش کرد. گاوهای مرده هیچ گونه نشانه بالینی یا کاهش شیر را نشان ندادند. در بررسی کالبدشناسی آنها، یافته هایی شامل ملنا و غشاهای موکوسی کمرنگ یافت شد. همچنین شیردان و روده های کوچک آنها پر از لخته های خون بود. در گاو های زمین گیر نیز علائم تاکی کاردی، تاکی پنه، ملنا و لایه های کمرنگ مخاطی مشاهده گردید. دمای بدن ۳۶/۵ درجه سلسیوس و تابلوی خونی نورموسیت، نورموکرومیک، آنمی دژنراتیو و حالت نرمال سلول های انعقادی دیده شد. در جیره این دام ها آفلاتوکسین های B_1 به میزان ۱۰ گرم بر کیلوگرم و B_2 به میزان ۵ گرم بر کیلوگرم یافت شد. دام زمین گیر با تجویز ویتامین های K و B_{12} و همچنین اکسی تتراسایکلین و حذف جیره آلوده بهبود یافت (Mitrofanov et al., 1989).

۴-۲-۲-۱: تشخیص آفلاتوکسیکوزیس در دام :

۱-۴-۲-۲-۱: نشانه های بالینی :

با توجه به حساسیت افراد هر گونه به آفلاتوکسین ها نشانه های بالینی در دام ها متفاوت است. نشانه های بارز در گوساله شامل کوری، دور خود چرخیدن، سائیدن دندان ها (دندان قروچه)، اسهال و دل پیچه است (Quine et al., 1994). در حالت مسمومیت فوق حاد نشانه های خونریزی، اسهال خونی و مرگ ناگهانی دیده می شود. جراحات مسمومیت حاد شامل خونریزی های متعدد و طولانی شدن زمان پروترومبین می باشد. مسمومیت تحت حاد ممکن است منجر به نارسایی کبدی همراه با زردی، بی اشتها، عدم تعادل، ناتوانی در امر تولید مثل، ضعف و لرزش های عضلانی، آهسته شدن حرکات شکمبه، اغما و مرگ گردد. در حضور مقادیر متوسط آفلاتوکسین، اختلال و تضعیف در عملکرد ایمنی نیز ممکن است دیده شود (اسمیت، ۱۳۷۷). کلیه ها در گاو ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد و ممکن است زرد رنگ شوند. (Quine et al., 1994)

۲-۴-۲-۲-۱: روش های آزمایشگاهی تشخیص آفلاتوکسیکوزیس در دام :

تشخیص آزمایشگاهی آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات نیاز به ملاحظه دقیق فاکتورهای اپیدمیولوژیکی و نشانه های بالینی در حیوانات تحت تأثیر قرار گرفته و یافته های بعد از مرگ دارد.

بررسی آزمایشگاهی موارد مظنون ممکن است به تشخیص میزان توانایی رشد قارچهای سمی در غذا کمک کند. شناسایی شیمیایی مایکوتوکسین ها در نمونه های غذایی ارائه شده و سنجش بیولوژیکی برای سمیت، یک مرحله تأیید کننده مهم در مجموعه نتایج است. آزمایشات طبیعی غذا ممکن است وجود قارچ با توانایی مسموم کنندگی را نشان دهد، ولی نتواند آفلاتوکسیکوزیس را تشخیص و به اثبات برساند. تأیید آزمایشگاهی مایکوتوکسیکوزیس احتیاج به اثبات وجود سویه های سمی *آسپرژیلوس فلاووس*، *آپارازایتیکوس* و سطوح توانایی سمی مایکو توکسین ها در غذا یا بافت ها به همراه یافته های پاتولوژیکی و یا کلینیکی دارد.

برای تشخیص آفلاتوکسیکوزیس در دام های بیمار تست های ذیل را می توان انجام داد :

- ۱- ارزیابی مقادیر آسپاراتات ترانسفراز (AST)،
- ۲- آلانین آمینو ترانس آمیناز (ALT)،
- ۳- گاما گلوتامین ترانسفراز (GGT)،
- ۴- آلکالین فسفاتاز (AP)،
- ۵- اورنیتین کاربامیل ترانسفراز و
- ۶- ایزو سیتریک دی هیدروژناز (اسمیت، ۱۳۷۷، مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶، Quine et al., 1994، Gary^b., 1996).

همچنین سرم آلبومین و همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین کاهش می یابد، پروترومبین تایم (PT) زیاد می شود. فعالیت پروترومبین در نتیجه کم شدن سنتز فاکتورهای انعقادی کم می شود. در فرم مزمن هایپر بیلی روبینمیا اتفاق می افتد (Gary^b., 1996).

بررسی آفلاتوکسین ها در شیر و ادرار حیوانات آلوده نیز در تشخیص کمک می کند. بیشتر آفلاتوکسین ها بعد ۶۹ تا ۷۲ ساعت در معرض قرار گیری دفع می شوند. اما درکبد و کلیه مدت زمان بیشتری باقی می ماند (تا دو هفته). در گاو های شیری، آفلاتوکسین های M_1 و M_2 که متابولیت های هیدروکسیله B_1 و B_2 می باشند، در شیر دفع می شوند که ممکن است سلامت عمومی افراد مصرف کننده را به خطر اندازد. شیر حاوی AFB_1 ایجاد آسیب کبدی می کند. AFM_1 در پنیرهایی که از شیرهای آلوده ساخته می شوند، به مدت سه ماه باقی می ماند. (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۰، تقی پور بازرگانی و همکاران، ۱۳۷۵)

۱-۲-۳-۴: اپیدمیولوژی :

آفلاتوکسیکوزیس در بیشتر کشورها در غذاهای ذخیره ای گزارش شده است. خصوصاً در بادام زمینی های برداشت شده، پوسته های بادام زمینی که به صورت علوفه درآمده، کنجاله پنبه دانه، جوی دو سر، ذرت، نان های مخمر، خوشه های سبز جو و خوشه ذرت شیرین. عموماً منبع آلودگی *آ فلاووس*، *آ پارازایتیکوس*، *آ نیجر*، *پنی سلیم توبرکلوم* و *آ کلاواتوس* می باشند. همه حیوانات مستعد این بیماری هستند، اما شیوع آن اغلب در خوک ها، گوسفند و گاو دیده می شود. به علت اینکه این سم از طریق شیر گاو دفع می شود، این بیماری در مورد سلامت عمومی افراد جامعه اهمیت دارد. امروزه آفلاتوکسین اهمیت قابل توجهی در ایجاد کارسینوماي هپاتوسلولار انسان دارد. غلظت آفلاتوکسین در شیر گاو ممکن است به بیشتر از ۳۳/۰ ppb برسد و به مدت سه الی چهار روز بعد از خوردن غذا ادامه یابد. آفلاتوکسین ها همچنین در گوشت حیواناتی که از غذاهای آلوده تغذیه می کنند، وجود دارند، ولی خطر خوردن گوشت های آلوده برای انسان کم است (Radostits et al., 2000). گفته شده است که آفلاتوکسین ها ممکن است از طریق اسپرم و اندام های تناسلی نر منتقل شود، البته این موضوع دقیقاً ثابت نشده است. در یک بررسی با استفاده از تکنیک RIA که بر روی ۱۵ نمونه غذایی مورد استفاده در یک ایستگاه تلقیح مصنوعی و همچنین ۳۴ نمونه اسپرم و منی جمع آوری شده و نمونه های بافت اپیدیدیم و بیضه ۲۱ گاو انجام گرفت، این نتایج به دست آمد که این نمونه ها از نظر

وجود AFB₁ و اوکراتوکسین، مثبت بودند و مقادیر آنها به ترتیب ۱/۹ - ۷/۲ و ۳/۳ - ۱/۸ گرم بر کیلوگرم در نمونه غذایی، ۱/۹ - ۸ و ۱ - ۴ گرم بر کیلوگرم در بافت های اپیدیدیم و بیضه بود (Rob et al., 2000).

۱-۲-۴-۴ : یافته های کالبدگشایی :

در همه گونه ها این یافته ها شامل هیپاتوزیس، مگالوبلاستوزیس سلول های کبدی، مشاهده کانون های نکروزه و فیبروزی، اینفلتراسیون سلولی در اطراف پورتال و هپیرپلازی مجاری صفراوی، زردی و اکسودای سروزه در حفرات بدن در برخی حیوانات ممکن است دیده شود. التهاب روده و کولون ها همراه با اسهال و اسهال خونی نیز وجود دارد (Radostits et al., 2000).

۱-۲-۴-۵ : تشخیص تفریقی :

مسمومیت با آفاتوکسین باید با موارد دیگر از مسمومیت ها و حالاتی که آسیب کبدی ایجاد می کنند تفریق شود. از جمله موارد ذیل را می توان نام برد :

- ۱- مسمومیت با آکالوئیدهای پیرولیزیدین،
- ۲- مسمومیت با اسپوریدسمین،
- ۳- مسمومیت با فوموپسین،
- ۴- مسمومیت با سموم سیانوباکتریها،
- ۵- مسمومیت با لانتادن،
- ۶- مسمومیت با استروئید ساپونین،
- ۷- فاسیولوزیس

۱-۲-۴-۶ : مسمومیت همزمان با سایر سموم قارچی :

برخی از محققان نتایجی را در مورد اثرات متقابل تغذیه آفاتوکسین ها وقتی همراه با دیگر مایکوتوکسین ها مصرف می شوند، به دست آورده اند. وقتی آفاتوکسین با دیگر مایکوتوکسین ها تغذیه می شوند، مسمومیت ایجاد شده به صورت پاسخی حاصل از مجموع مایکوتوکسین ها ظاهر می شود. به ندرت پاسخ مجموع مایکوتوکسین ها کمتر از پاسخ تنهای آفاتوکسین می باشد و اغلب پاسخ بیشتر از مسمومیت با آفاتوکسین به تنهایی است. وقتی ۲/۵ ppm آفاتوکسین با ۵ ppm دی استو اکسی سیرپنول (DAS) همراه شود، یا وقتی ۳/۵ ppm آفاتوکسین و T-2 toxin در غذای مصرفی جوجه های تخمگذار وجود داشته باشد، نتیجه معمول آن همراه شدن سموم با هم (سینرژسم) برای کاهش اخذ وزن می باشد. بره هایی که همراه غذا ۲/۵ ppm آفاتوکسین و ۵ ppm DAS مصرف می کنند، پاسخ سینرژسم حاصل از این سموم باعث کاهش اخذ وزن، حجم بیوشیمیایی سرم و ضایعات شدید کبدی می شود (Haward, 1999).

۱-۲-۴-۷ : کنترل و پیشگیری :

پیشگیری از آلودگی در تمام مراحل تولید غذا، ذخیره و استفاده روشی است که برای جلوگیری از بروز آفاتوکسیکوزیس عرضه شده است. این نحوه برخورد می تواند به وسیله کاهش عفونت های قارچی در محصولات برداشت شده به وسیله خشک کردن سریع محصولات دروشده و یا به وسیله استفاده از مواد ضد قارچ مؤثر، تکمیل گردد. خطر آلودگی با آفاتوکسین ها اغلب در مواردی زیاد است که امکان تشخیص این آلودگی وجود ندارد، به خصوص که حالات آب و هوایی آسیب های مربوط به کپک را در غذای ذخیره شده، همراهی می کند. هدف استراتژیک برای رفع آلودگی شامل برداشت فیزیکی، غیر فعال کردن توسط حرارت، پرتودهی، از بین بردن عوامل میکروبی و معالجه شیمیایی غذاهای آلوده به آفاتوکسین است. برداشت فیزیکی و غیرفعال کردن شیمیایی سموم در غذای آلوده به عنوان یک روش تجاری در اغلب کشورها استفاده می شود. اسیدها، قلیاها، آلدئیدها، داروهای اکسیدکننده و گازهای انتخابی برای از بین بردن آفاتوکسین ها استفاده می شود. گاز آمونیاک در درجه حرارت و فشار بالا مولکول های آفاتوکسین را می شکند و ادعا شده است که غذاهای آمونیاکی می

تواند بی خطرترین غذا برای حیوانات باشد. غذای مشکوک یا مواد آلوده به آفلاتوکسین که آلودگی آن برطرف نشده است، نباید به عنوان غذا به گاو شیریه داده شود، زیرا خطر انتقال AFM_1 از طریق شیر وجود دارد. مواد و ترکیبات جذب کننده غیر آلی مانند سدیم، کلسیم آلومینوسیلیکات هیدراته که به غذا اضافه می شوند، با آفلاتوکسین ترکیب و در دسترس قرارگیری بیولوژیکی آن را کاهش می دهند. در مواردی که روش های فیزیکی ذخیره نامناسب باشد، مواد شیمیایی جلوگیری کننده از فساد مورد استفاده قرار می گیرد. در کل استفاده از مواد شیمیایی در موقع درو می تواند رشد قارچ ها را کاهش دهد. در حالی که سایر مواد نمی تواند این کار را انجام دهند. اسیدهای آلی مختلف مانند بنزوئیک اسید و پروپیونیک اسید به طور وسیع برای ذخیره تولیدات کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرند. (اسمیت، ۱۳۷۷، Gary^b، 1996، Quine et al.، 1994، Lopez^a et al.، 2001، Radostits et al.، 2000)

۱-۲-۴-۸ : درمان :

داروی خاصی برای درمان این مسمومیت و از بین بردن اثرات سمی آفلاتوکسین وجود ندارد. درمان حمایتی و علامتی باید انجام شود. شخص معالج باید بداند که آفلاتوکسین یک هپاتوتوکسین بوده و معالجه باید بر این اساس طراحی شود. غذای آلوده باید حذف شود و میزان مایکوتوکسین های آزاد باید به وسیله پروتئین تقویتی و آمینواسیدهای محدودکننده کنترل شود. شیر آلوده با آفلاتوکسین در مزارع گاوهای شیریه نباید به تغذیه گوساله ها برسد (Radostits et al.، 2000). در برخورد با موارد آفلاتوکسیکوزیس نخستین عملی که باید انجام گیرد، تهیه یک رژیم غذایی مناسب است که میزان آلودگی را در بدن کاهش می دهد. همچنین کولین، اینوزیتول، ویتامین B2 و ویتامین E، باعث جلوگیری از ایجاد ضایعات کبدی ناشی از آفلاتوکسین می گردند (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶).

۱-۲-۵ : آفلاتوکسیکوزیس و آفلاتوکسین ها در ماهیان :

۱-۲-۵-۱ : حضور آفلاتوکسین ها در خوراک ماهیان و اپیدمیولوژی آفلاتوکسیکوزیس در آبزیان :

اولین شیوع مستند آفلاتوکسیکوزیس که سلامتی ماهیها را تحت تأثیر قرار داد در سال ۱۹۶۰ میلادی در قزل آلاي پرورشی اتفاق افتاده است. قزل آلاهای رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) که با غذای پلت شده حاوی پنبه دانه های آلوده به آفلاتوکسین، تغذیه شده بودند، دچار تومورهای کبدی شدند. در حدود ۸۵٪ ماهیان مردند. اگرچه پنبه دانه به عنوان جزئی از فرمولاسیون ماهی ها، چندان استفاده نمی شود، ولی کمبود ذخیره دیگر ترکیبات اصلی و به منظور تکمیل خوراک، منجر به استفاده از پنبه دانه شده که به آلودگی با آفلاتوکسین منتهی شده است (Roya et al.، 2002).

آفلاتوکسیکوزیس در حال حاضر در صنعت پرورش آبزیان و ماهیان قزل آلاي رنگین کمان کمتر شده است، که این به دلیل نظارت دقیق اعمال شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) بر روی حضور آفلاتوکسین در دانه های روغنی، ذرت و دیگر ترکیبات مواد غذایی، می باشد. در حال حاضر توجه به اثرات سمی آفلاتوکسین ها بر ماهیان گرم آبی پرورشی، مثل تیلاپیا و گربه ماهی بستر رودخانه، افزایش یافته است. نوع تغذیه برای این گونه ها در حال حاضر با محتوای بیشتر گیاهی، فرموله شده اند و کمتر از منابع حیوانی استفاده می شود. این مسئله پتانسیل افزایش آفلاتوکسیکوزیس در این گونه ها را بالا می برد، به این دلیل که ترکیبات گیاهی پتانسیل بالاتری از ترکیبات حیوانی برای آلوده شدن با آفلاتوکسین ها دارند. در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری این پتانسیل ها بیشتر افزایش می یابد، چرا که ذخایر غذایی تحت شرایط رطوبت و حرارت قرار دارند (Roya et al.، 2002).

گسترش بیماری، در نتیجه آفاتوکسین ها، به سن و گونه آبیان نیز وابسته است. بچه ماهی ها نسبت به آفاتوکسیکوزیس در مقایسه با ماهیان بالغ حساس ترند و بعضی گونه ها به آفاتوکسین نسبت به دیگران حساسترند. مطالعات بر روی تیلاپیا رودخانه نیل (*Oreochromis niloticus*) نشان داده است میزان رشد ماهی، زمانی که از جیره حاوی ۱۸۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ (برابر ۱۸۰۰ گرم از AFB₁ در یک میلیون کیلوگرم جیره) به مدت ۷۵ روز استفاده شود، کاهش می یابد. به علاوه بافت غیر طبیعی و جراحت در کبد این تیلاپیاهای شروع توسعه سرطان در کبد را نشان داده است.

در آبهای سبز و سیستم های با آب جاری، وجود آفاتوکسین به مقدار ۲۵ تا ۳۰ در آب، بدون هیچ گونه علایم قابل مشاهده یا مرگ و میر، باعث کاهش رشد می شود. از طرفی در سیستم های پرورش در قفس، غلظت های آفاتوکسین در حدود ۵ ppb باعث افزایش مرگ و میر می شود.

قزل آلائی رنگین کمان فوق العاده به AFB₁ حساس است، در حالیکه گربه ماهی بستر رودخانه (*Ictalurus punctatus*) بسیار کمتر در مقابل AFB₁ آسیب پذیر است.

قزل آلائی رنگین کمان تغذیه شده با جیره آلوده به AFB₁ در حدود ۵۰۴ ppb به مدت ۱۵ ماه تا ۱۴٪ امکان ابتلا و رشد تومورها را دارد. قزل آلائی تغذیه شده با جیره ای حاوی AFB₁ به میزان ۲۰ ppb به مدت ۸ ماه، در ۵۸٪ موارد دچار تومور کبدی شده اند و ادامه تغذیه تا ۱۲ ماه نتیجه را به ۸۳٪ شیوع تومورها کشانده است. گربه ماهی های بستر رودخانه تغذیه شده با جیره حاوی مقدار ۱۰۰۰۰ ppb AFB₁ به مدت ۱۰ هفته کاهش میزان رشد را بروز داده است و جراحت های داخلی متوسط بودند. (Royes et al., 2002)

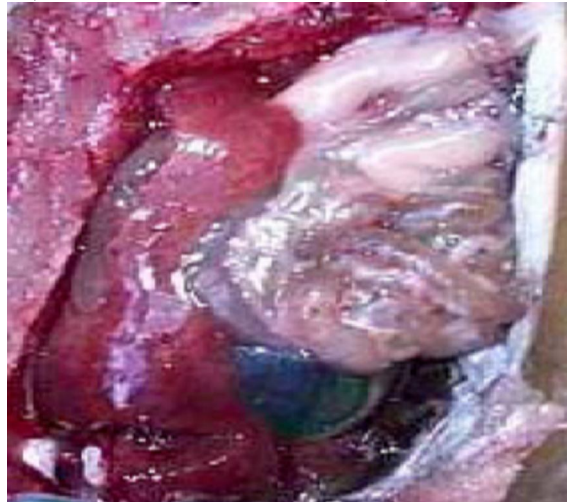
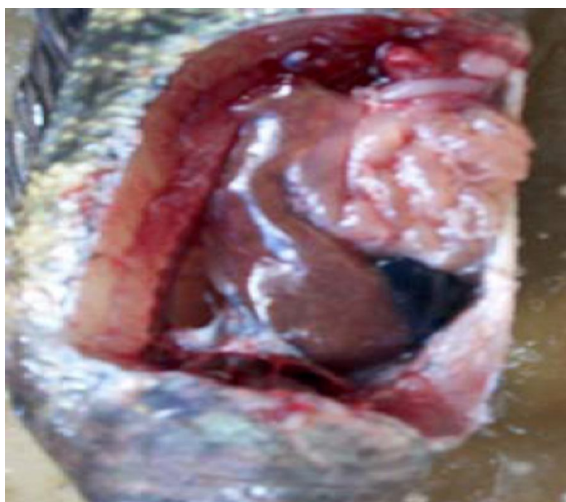
در طی مطالعات Nguyen و همکارانش در سال ۲۰۰۲، واکنش ماهی Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) به مقادیر متغیر آفاتوکسین B₁ در شرایط آزمایشگاهی تحت کنترل مورد بررسی قرار گرفته است. ماهی ۲/۷ گرمی با رژیم محتوی ۰/۲۵، ۰/۵، ۲/۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم آفاتوکسین بر کیلوگرم رژیم غذایی برای مدت ۸ هفته تغذیه شدند. وزن زنده و هماتوکریت ماهیان تغذیه شده با مقادیر ۰/۲۵ mg/kg آفاتوکسین B نتایج معنی داری (P<0.05) بر کاهش وزن و هماتوکریت نشان داد. از نظر بافت شناسی، کبد ماهی تغذیه شده با مقادیر ۱۰ mg/kg آفاتوکسین، محتوی لیپوفوشین زیادی از حد و هسته های با اندازه های نامنظم در سلولهای کبدی بود. رژیم های محتوی ۱۰۰ mg/kg آفاتوکسین با کاهش وزن و نکروز کبدی پراکنده همراه بود. ۶۰٪ ماهیان در این فرایند و در اواخر دوره تغذیه ۸ هفته، مردند. هیچ جراحی در طحال، معده، روده، قشر کلیه و قلب ماهی در طول دوره دیده نشد. این نتایج نشان داد که اثرات حاد و تحت مزمن AFB بر ماهی تیلاپیا، در صورتیکه غلظت آفاتوکسین در رژیم غذایی آن ها ۰/۲۵ mg/kg یا کمتر باشد، غیر محتمل است (Nguyen et al., 2002).

در مطالعه ای دیگر توسط Sahoo و همکارانش در سال ۲۰۰۱، تغییرات پاتولوژیکال در ارگان های مختلف ماهی Rohu (*Labeo rohita*) / Hamilton، یک ساله (بند انگشتی) به دنبال در معرض قرار دادن داخل صفاقی آفاتوکسین B₁ به مدت ۱۰ و ۹۰ روز به ترتیب به صورت حاد (acute) (مقادیر ۰، ۷/۵، ۱۱/۲۵ و ۱۳/۷۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) و تحت مزمن (sub chronic) (مقادیر ۰، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) مورد بررسی قرار گرفت. مرگ فقط در طی مسمومیت حاد مشاهده شد. تغییرات در ارگان های مختلف به دوز و زمان وابسته بود. گروه های تحت تأثیر دز حاد، تغییرات توکسیک را به صورت تغییرات نکروتیک و واسکولار در کبد و آبشش ها، مننژیت، تراکم مغزی، واکنش دژنراتیو و التهابی قلبی در قلب، تغییرات دژنراتیو تا نکروتیک توبول های کلیوی و تورم مخاط روده، نشان داد. در طی در معرض قرار گرفتن تحت مزمن، زخم های پرنئوپلاستیک در کبد همراه با تغییرات در طحال، روده، آبشش ها و پانکراس گزارش شده است. با دزهای پایین آفاتوکسین، ماهی هیچ نوع مرگ یا نشانه های شدید غیر از کاشکسی و کاهش پیگمانتاسیون در فلس ها، نشان نداد. این مشکلات (کاشکسی) می تواند در

پرورش ماهیان از نظر اقتصادی تأثیرگذار باشد (Sahoo et al. , 2001). این مطالعات تفاوت در حساسیت ماهیان را به آفاتوکسین نشان می دهد.

۲-۵-۲-۲-۱ : علایم آفاتوکسیکوزیس در ماهیان :

یافته های اولیه وابسته به آفاتوکسیکوزیس شامل آبشش های رنگ پریده، اختلال در لخته خون، کم خونی، بروز زخم در سطح بدن و دیگر اندام های داخلی، رشد ناکافی یا فقدان افزایش وزن می باشد. تغذیه طولانی مدت از غلظت های کم AFB_1 منجر به تومورهای کبدی می شود که با جراحات زرد کم رنگ مشخص می شود و می تواند به کلیه گسترش یابد. افزایش مرگ و میر نیز ممکن است دیده شود. (شکل های ۳-۲-۱ تا ۶-۲-۱)



شکل ۳-۲-۱ : اثرات آفاتوکسیکوزیس در ماهی تیلاپیا، کبد ماهی سالم (طرف راست) و کبد ماهی تغذیه شده با غذای آلوده به آفاتوکسین (طرف چپ) (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)

آفاتوکسین ها می توانند به طور غیر مستقیم با اثر گذاری روی مواد مغذی جیره، باعث ایجاد بیماری شوند. به عنوان مثال آنتی اکسیدان های محلول در چربی نظیر ویتامین A و آنتی اکسیدان های محلول در آب نظیر ویتامین C (که برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی بدن مورد نیازند) و تیامین (ضروری برای عملکرد مناسب فعالیت های متابولیکی و عصبی) می توانند توسط این سموم در مواد غذایی تخریب شوند.

در تحقیقی توسط Ottinger و Kaattari در سال ۱۹۹۸، مشخص شده است که در معرض قرار دادن ماهی قزل آلا رنگین کمان به آفاتوکسین B_1 به میزان ۰/۵ میلی گرم به مدت ۳۰ دقیقه، باعث اختلال در عملکرد سیستم ایمنی بدن ماهی می شود که با افزایش پرولیفراسیون لکوسیت ها و افزایش تولید ایمنوگلوبولین ها، می شود. (Ottinger & Kaattari , 1998)



شکل ۱-۲-۴ : عوارض آفاتوکسیکوزیس در ماهی - ایجاد زخم های سطحی (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)

به همین دلایل شگفت انگیز نخواهد بود که آفاتوکسین ها عامل دپرس سیستم ایمنی باشند که همین خود باعث آسیب پذیری بیشتر ماهی ها به دیگر بیماری های باکتریایی، ویروسی، انگلی و قارچی می شود. متأسفانه به این مسائل در پرورش ماهیان و دیگر آبزیان پرورشی توجه خاصی نشده و بدین سان سود کاری به دست نخواهد آمد و خسارات زیادی عاید خواهد شد، به ویژه به دلیل کاهش کارایی در تولید، رشد آهسته، کاهش وزن نهایی تولید، افزایش میزان غذای مورد استفاده به منظور افزودن به وزن (جبران کاهش وزن) و افزایش هزینه های درمانی. (Royes *et al.*, 2002)



شکل ۱-۲-۵ : عوارض آفاتوکسیکوزیس در ماهی - رشد ناکافی و تغییر رنگ اندام های سطحی در ماهی طرف چپ (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)



شکل ۱-۲-۶ : عوارض آفاتوکسیکوزیس در ماهی - رشد ناکافی و تغییر رنگ اندام های سطحی در ماهی طرف چپ (تصاویر از اینترنت گرفته شده اند)

۱-۲-۲-۵-۳ : نظارت و کنترل آفاتوکسین ها در آبیان پرورشی :

خرید مواد خوراکی ماهیان که به تازگی تدارک دیده شده اند و به طور مناسب ذخیره شده اند، توصیه می شود. آب و آشغال می بایست از ترکیبات غذا دور ریخته شوند و غلات باید در جعبه ها یا مکان های تمیز نگهداری شوند. در صورت امکان تمام غذای آبی ، در یک مکان با هوادهی مناسب به منظور کنترل درجه حرارت و رطوبت، ذخیره شوند. در غیر این صورت خوراک می بایستی روی سطح زمین قرار نگرفته و در یک مکان خشک و خنک روی پالت قرار گیرند و این نباید از ۳ ماه بیشتر طول بکشد. اگر مواد غذایی در خارج از جعبه های مخصوص نگهداری می شوند، نگهداری بیش از دو هفته توصیه نمی شود.

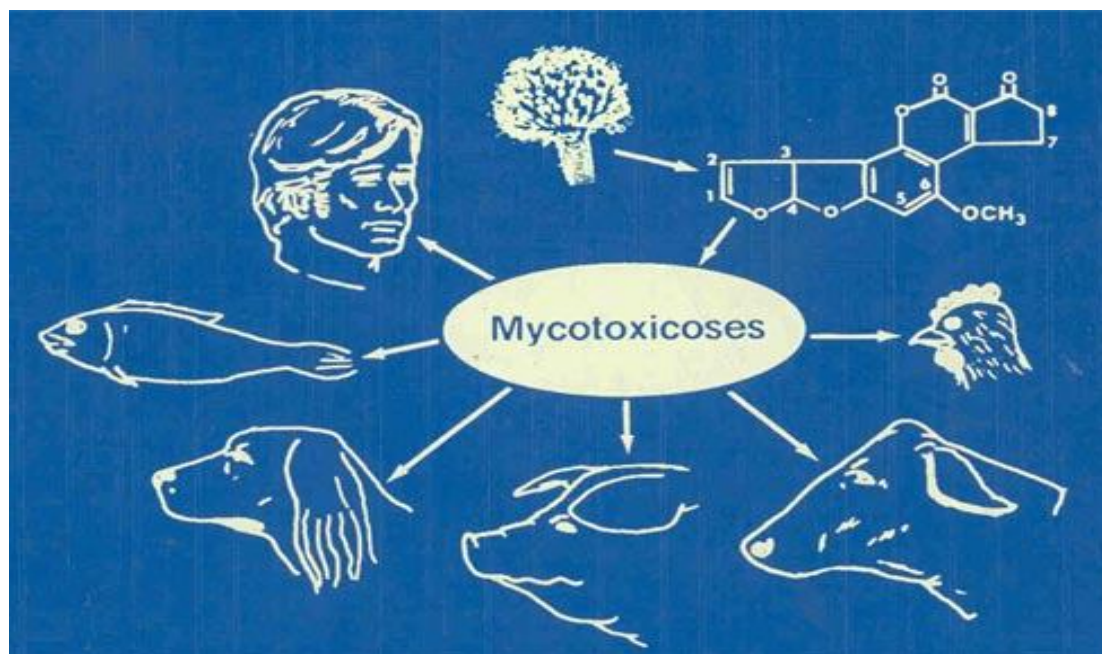
اگر مواد غذایی بیش از دوره مشخص ذخیره شوند یا در مکان نامناسب قرار گیرند، مشکلات سلامت ماهیان افزایش می یابد، که این نه فقط به خاطر قارچ هاست، بلکه به دلیل کاهش ویتامین ها و تند شدن (فساد) چربی ها ، هم می باشد. مواد خوراکی ذخیره شده برای یک مدت زمان طولانی و احتمالاً آلوده به قارچ ها، دارای حالت کهنگی و ماندگی و رنگ پریده می باشند، کلوخه شده و بوی ماندگی و کپک زدگی دارند. مواد غذایی مانده اغلب با رطوبت اشباع بوده و خیس و تر به نظر می آیند. تست تنظیمی برای آفاتوکسین ها ایده خوبی در این زمینه است. بررسی ساده در فارم، می تواند به صورت بصری انجام شود (با نگاه کردن به حضور قارچ های آبی/خاکستری روی خوراک)، یا می توان از روش black light استفاده کرد که در صورت وجود اسپرژیلوس فلاووس، رنگ فلورسنت زرد متمایل به سبز ایجاد می شود. البته این روش در عین حال که سریع است، فقط نشانگری بر حضور آ. فلاووس است.

کیت های تجاری نظیر Veratox[®] برای آفاتوکسین ها و کیت های Afla BTM به منظور دتکت غلظت آفاتوکسین ها در مواد خوراکی، در حال حاضر به راحتی در دسترس هستند (از طریق کمپانی هایی نظیر شرکت نوژن و VICAM). اینها به راحتی قابل استفاده بوده و به کمتر از ۲۰ دقیقه برای آنالیز نیازمندند، ارزانند و می توانند در فارم مورد استفاده قرار گیرند. متدهای متعارف آنالیز آزمایشگاهی به منظور دتکت دقیق غلظت های آفاتوکسین ها شامل پروسه های استخراج شیمیایی، گراند و توسط تکنیک هایی مثل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) و الیزا (ELISA) و... انجام می شود. به هر حال این روش ها اغلب وقت گیر، گران و دشوارند. (Royes et al., 2002)

یک راه حل ممکن برای غذاهای با آلودگی کم قارچی استفاده از غیرفعال کننده ها در غذای آبزیان است. مثلاً عاملی نظیر Toxy-nil[®] رشد قارچ ها را با باند شدن به آفاتوکسین ها، غیر فعال کردن آن ها و جلوگیری از رشد بیشتر قارچ ها، باعث می شود. ولی اگر خوراک به شدت آلوده شده باشد، باید دور ریخته شده، و جیره جدید خریداری شود. بدین سان افزایش آگاهی و نظارت دائم بر آفاتوکسین ها در مواد غذایی، خطر وقوع آفاتوکسیکوزیس را در آبزیان پرورشی کاهش می دهد. (Royes et al., 2002)

۶-۲-۲-۱ : آفاتوکسین ها و سلامتی انسان :

انسان ها با مصرف مواد غذایی با منشأ دامی و گیاهی آلوده به قارچ ها و سموم مربوط، در معرض آفاتوکسین ها قرار دارند. پیشگیری از چنین در معرض قرار گرفتن هایی مشکل است. چرا که رشد قارچ ها در غذای انسان به راحتی قابل پیشگیری نیست. هر چند در کشورهای پیشرفته به شدت از عرضه مواد غذایی آلوده شده جلوگیری می شود، نگرانی ها باز باقی مانده اند. چرا که امکان ایجاد اثرات نامطلوب ناشی از در معرض قرار گرفتن طولانی مدت با سطوح کم آفاتوکسین ها در مواد غذایی وجود دارد (شکل ۳-۲-۱).



شکل شماره ۳-۲-۱ : انتقال میکوتوکسین ها به گونه های مختلف به حیوانات و انسان

ابتلای به آفاتوکسیکوزیس حاد در انسان از بسیاری از نقاط دنیا گزارش شده است، به ویژه در کشورهای جهان سوم نظیر تایوان، اوگاندا، هند و بیشتر کشورهای جنوب شرقی آسیا و کشورهای آفریقایی و آمریکای لاتین و... . سندرم مربوط با استفراغ، دردهای شکمی، ادم دستگاه تنفسی، تشنج، کوما و مرگ با ادم مغزی و درگیری چربی کبد، کلیه ها و قلب، مشخص می شود.

عوامل افزایش احتمالی آفاتوکسیکوزیس حاد در انسان مشتمل است بر محدود شدن وصول غذا، عوامل محیطی که رشد قارچ ها را در محصولات کشاورزی و فراورده های مربوط مساعد می کند و عدم وجود سیستم های نظم دهنده برای کنترل آفاتوکسین در مواد غذایی مختلف.

به دلیل اینکه آفاتوکسین ها به ویژه آفاتوکسین B₁، به طور قوی در بعضی دام ها کارسینوژن هستند، توجه زیادی به اثرات طولانی مدت در معرض قرار گرفتن سطوح کم این مایکوتوکسین های مهم در انسان شده است. در سال ۱۹۸۸، آژانس بین المللی تحقیقات سرطان یا International Agency for Research on Cancer/IARC، آفاتوکسین B₁ را در لیست کارسینوژن های انسانی قرار داد. این مسئله توسط بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکال در آسیا و آفریقا مورد حمایت قرار گرفته است که ارتباط مثبتی را ما بین تغذیه از آفاتوکسین ها و سرطان سلول های کبدی، نشان داده اند. به علاوه بروز بیماری های وابسته به آفاتوکسین در انسان ها ممکن است تحت تأثیر فاکتورهایی نظیر سن، جنس، حالت های تغذیه ای و/ یا در معرض قرار گرفتن همزمان با دیگر عوامل نظیر هپاتیت ویروسی یا آلودگی های انگلی باشد. (Saad, 2005)

مسمومیت حاد آفاتوکسینی از طریق مواد غذایی آلوده در انسان با خوردن ۲ تا ۶ میلی گرم در روز به مدت یک ماه گزارش شده است که اثرات اصلی آن اغلب مسمومیت کبدی و قلبی می باشد. اما در رابطه با اثر دوم شواهد کمی در انسان وجود دارد. همین طور همه گیری بزرگی از هپاتیت سمی در ۱۵۰ دهکده در گوجرات و راجاستان هندوستان متعاقب مصرف ذرت آلوده رخ داده است که ۱۰۰۰ نفر بیمار و ۳۰۰ تلفات به همراه داشت. بیماری که عمدتاً مردهای بزرگسال و نوزادان و بچه های لاغر و نحیف را مبتلا کرد، دارای یک شروع تحت حاد با تب بوده که سریعاً به زردی پیشرفته و آسیت منتهی شد. استفراغ و هپاتواسپلینومگالی هم در برخی بیماران دیده شده و بالا رفتن آلکالین فسفاتاز هم مشهود بود. جالب اینکه سگ های تغذیه کرده با ته مانده های غذای انسان ها هم آسیت و زردی را بروز دادند. در کبد ۱۰ بیمار که آزمایش شد، انسداد صفراوی، فیبروز دور مجرا و پرولیفراسیون وسیع مجرای صفراوی به انضمام ادم و افزایش فیبروز وریدهای مرکزی و ترانسفرماسین سلول های غول پیکر یافت شد. ولی مقادیر قابل توجهی از پارانشیم طبیعی، باقیمانده بود. در سال ۱۹۸۲ هم گزارش دیگری از هپاتیت حاد سمی توسط Ngindu و همکارانش در کنیا داده شد که ۲۰ بیمار و ۱۲ مورد مرگ با تظاهرات و موارد مشابه مورد فوق الذکر، دیده شد.

بیماری انسدادی وریدی که تحت تأثیر غذای آلوده به آفاتوکسین ممکن است در گاو دیده شود، در انسان دیده نشده است. دو نوع بیماری دیگر یعنی کارسینومای اولیه کبد و سندرم Reye در انسان دیده شده که با مصرف آفاتوکسین همراه بوده است. سندرم Reye در بچه ها به صورت آنسفالوپاتی و دژنراس چربی کبد رخ می دهد و آسیب کبدی ناشی از آفاتوکسین، به طور آشکار، یکی از چند عامل ایجادکننده این سندرم است.

بخش سوم :

۱-۳ : راه های جلوگیری از آلودگی محصولات غذایی با سموم قارچی :

۱-۳-۱ : مقدمه :

یکی از دلایلی که باعث اهمیت سموم قارچی شده است، این است که این سموم می توانند همراه با غلات آلوده وارد زنجیره های غذایی انسان و حیوانات گردند. همچنین غذاهایی مانند شیر، گوشت (قرمز، سفید ماکیان و ماهیان) و تخم مرغ که از حیوانات به دست می آید، در صورت مسمومیت دام با این سموم برای سلامتی انسان خطرناک باشند. خواص شیمیایی، بیولوژیکی و سم شناختی میکوتوکسین ها بسیار متغیر است، از این رو تأثیرات سمی آن گسترده بوده و درجه جذب، مدت باقی ماندن، مدت زمان در معرض قرارگیری، گونه حیوان و... دارد. کشورهای مختلف جهان برای محدود کردن ورود میکوتوکسین ها در طول زنجیره غذایی استانداردهای مختلفی اعمال کرده اند. مثلاً در آمریکا مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر باید کمتر از ۰/۵ ppb باشد، در حالی که در اتحادیه اروپا حداکثر مقدار آن باید کمتر از ۰/۰۵ ppb باشد. به طور معمول سازمان دارو و غذای آمریکا (FDA) فقط آفلاتوکسین را در بین میکوتوکسین ها کنترل می کند و دامنه اثر AFB_1 را در سطح ۲۰ تا ۳۰۰ ppb در غذای حیوانات تعیین کرده است. (جدول ۱-۳، ۲-۳ و ۳-۳)

طبیعت خطر زای آفلاتوکسین برای انسان و حیوان نیاز به ایجاد معیارهای کنترلی و مقادیر تحمل توسط مسئولین ملی و بین المللی را ضروری می سازد. کشورهای مختلف قوانین متفاوتی در خصوص آفلاتوکسین دارند. تمایل عمومی این است که معمولاً کشورهای صنعتی که اغلب در آنجا کالاهای حساس تولید می شود، مقادیر تحمل پایین تری را نسبت به کشورهای در حال توسعه اجرا کنند. برای مثال مقدار تحمل برای آفلاتوکسین در غذاها در سوئد 5 g/kg و در ژاپن 10 g/kg در سال ۱۹۸۹ بوده است. در حالی که در آن زمان این مقدار در برزیل 30 g/kg بوده است. به هر حال این فقدان هماهنگی، ممکن است موجب افزایش مشکلات در تجارت برخی کشور ها می شود.

اولین فعالیت قانونگذاری (legislation) در سال ۱۹۶۵ توسط اداره کل غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) به عهده گرفته شد که مقدار تحمل 30 g/kg آفلاتوکسین توتال پیشنهاد شد. با افزایش آگاهی در مورد آفلاتوکسین ها به عنوان مواد توکسیک بالقوه مقدار پیشنهاد شده به 20 g/kg در سال ۱۹۶۹ کاهش یافت. بعدها مقادیر تحمل مورد تجدید نظر قرار گرفت. مقدار تحمل رایج وضع شده توسط FDA برای غذاهای انسان و دام در جدول ۱-۳-۱ آمده است.

در سال ۱۹۷۳ کمیته اقتصادی اروپا (EEC) قانونی را برای حداکثر مجاز مقادیر AFB_1 در انواع مختلف مواد غذایی وضع کرد. این قانون بعدها به طور مرتب اصلاح شد. گرچه چارچوب اصلی قانون کمابیش به همان صورت باقی ماند. جدول ۱-۳-۲ حداکثر مقادیر AFB_1 در غذاهای حیوانات که توسط ECC وضع شده است را لیست کرده است. این قانون از ۳۰ نوامبر ۱۹۹۱ اجرا شده است.

آلودگی کالاهای کشاورزی با آفلاتوکسین و در نتیجه وضع قانون یکی از نگرانی های اساسی کمیته های کاری مشترک FAO/WHO بوده است. کمیته ها توصیه می کنند که وجود آفلاتوکسین در غذا باید تا مقادیر غیر قابل کاهش (Irreducible level) محدود شود. یک مقدار غیر قابل کاهش به این صورت تعریف می شود : « غلظت یک ماده که نمی توان آن را بدون دور انداختن تمام غذا، حذف کرد. » قوانین رایج آفلاتوکسین وضع شده توسط کمیته های مشترک FAO/WHO در جدول ۱-۳-۳ آمده است.

مسئولین هلندی در طی سال های ۱۹۸۶ و ۱۹۸۷ یک تحقیق جهانی را بر عهده گرفتند که در آن از ۶۶ کشور خواسته شد که قوانینشان و محدوده های تحمل برای میکوتوکسین ها در غذای انسان و غذاهای حیوانات را گزارش کنند. از ۶۶ کشور، ۵۵ کشور قوانینی برای آفلاتوکسین ها در غذای انسان، ۳۵ کشور برای آفلاتوکسین در مواد غذایی دامی و ۱۴ کشور برای آفلاتوکسین M_1 در شیر و

فرآورده های لبنی وضع یا پیشنهاد کرده بودند. طیف وسیعی از قوانین آفاتوکسین در این کشور ها توسط Van Egmond در سال ۱۹۸۹ تهیه شد که بعداً در سال ۱۹۹۱ توسط Stoloff و همکارانش به روز گردید. بررسی نشان داد که در اکثر کشورهای تحت مطالعه، اساس و پایه برای وضع محدوده های تحمل و قوانین برای آفاتوکسین، بر اساس گفته های تأیید نشده مبهم خطر سرطان زایی برای انسان در معرض آفاتوکسین قرار گرفته، بوده است. تردیدی در مورد ضررهای اقتصادی شدید مایکوتوکسین ها وجود ندارد، گفته شده است که حتی در حالات آب و هوایی مساعد و مطلوب، در نتیجه آلوده شدن غلات با مایکوتوکسین ها میلیون ها دلار خسارت به محصولات غذایی وارد می شود. بر اساس این دلایل جلوگیری و پیشگیری از آلودگی، زدودن آلودگی از این مواد و همچنین سم زدایی از مایکوتوکسین ها دارای اهمیت زیادی است. به طور کلی رهیافت های ارائه شده برای کاهش سمیت و تأثیرات اقتصادی مایکوتوکسین ها باید تا سرحد امکان موارد زیر را در برگیرد :

الف) پیشگیری، از بین بردن و سم زدایی مایکوتوکسین های موجود در غذا،
 ب) جلوگیری از تولید یا باقیماندن سم و یا مواد سرطان زا و جهش زا در تولیدات نهایی،
 ج) عدم ایجاد تغییر چشمگیر در خواص تغذیه ای غذا و مواد تغذیه ای،
 د) درپیش گرفتن روش های مناسب تکنیکی و اقتصادی (Galvano & Andrea, 2001)

اطلاعات و دانسته های ما در مورد سمیت، مدت زمان پایداری و گستره شیوع بیشتر مایکوتوکسین ها محدود است. به همین منظور امروزه مطالعات زیادی در مورد روش های کنترل انجام گرفته است. مشکل دیگر که جدیداً در مورد کنترل سموم قارچی ایجاد شده، وجود گزارش های متعدد در مورد آلودگی های مایکوتوکسینی به صورت همزمان می باشد. اطلاعات سم شناختی در مورد اثرات هم زمان این نوع در معرض قرار گیری، هنوز چندان مشخص نیست. مطالعات نشان داده است که در معرض قرار گیری هم زمان AFB_1 و فومونیزین B_1 ممکن است پاسخ های دیگری متفاوت از پاسخ هایی که سم ها وقتی به طور انفرادی هستند، ایجاد کند. این پاسخ ها ممکن است به وسیله دسته ای از چندین فاکتور که مستقیماً واکنش های شیمیایی را کنترل یا راه های متابولیک مختلف را مهار یا تحریک می کنند، ایجاد می شود.

جدول ۱-۳-۱ : سطوح تolerانس آفاتوکسین توتال FDA در مواد غذایی انسان و دام (Ruston , 1997)

Item	Tolerance level ($g\ kg^{-1}$)
Food for human consumption	20
Feed for beef cattle and poultry	300
Feed for swine	200
Feed for breeding livestock	100
Feed for dairy cattle	20
Milk	0.5

جدول ۱-۳-۲: سطح ماکزیمم مجاز آفلاتوکسین B₁ در انواع غذاهای دامی وضع شده توسط EEC (کمیته اقتصادی اروپا)

Feed	Level (?g kg ⁻¹) ^a
<i>Straight feeds</i> Peanut, copra, palm kernels, cotton, seed, babassu, maize and products derived therefrom	20
<i>Compound feeds</i> Complete feeds Feeds for cattle, sheep and goat (except dairy cattle, calves and lambs)	50
Feeds for pigs and poultry (except young animals)	20
Other complete feeds	10
Complementary feeds Feeds for cattle , sheep and goats (with exception of dairy animals)	50
Feeds for pigs and poultry (with exception of young animals)	30
Other complementantary feeds	5

^a Based on feed moisture content of 12%

پاسخ نهایی ممکن است به واسطه تعادل بین چندین عکس العمل به وجود آید (Lopez^b et al., 2001).

به دلایل مختلف ارائه یک روش کنترلی واحد و مطمئن برای کنترل مایکوتوکسین ها امکان پذیر نیست و با تکیه بر یک روش خاص نمی توان از خطر ایجاد آلودگی های مایکوتوکسینی مطمئن شد. آلودگی های مایکوتوکسینی در طبیعت به صورت های مختلفی ایجاد می گردد. گفته شده است، که همه انواع آلودگی های مایکوتوکسینی را می توان با توسعه برنامه های ایمن سازی مواد غذایی برای کنترل مایکوتوکسین ها کنترل کرد که البته کار آسانی نیست. برنامه کنترلی برای پروسه های غذا و تغذیه باید بر پایه رهیافت آنالیز خطر ها و کنترل نقاط بحرانی (HACCP) باشد و باید استراتژی به کار برد که بر تمام مراحل، شامل جلوگیری از ایجاد آلودگی، بهبود روش های تولید، کنترل کیفیت محصولات در همه مراحل تولید از مزرعه تا مصرف کننده نهایی را دربرمی گیرد. مدیریت در مدت قبل از درو، بهترین روش کنترل مایکوتوکسین هاست، اما وقتی آلودگی اتفاق افتاد، خطرهای ناشی از

جدول ۱-۳-۳: ضوابط مربوط به حدود آفلاتوکسین که توسط کمیته تخصصی مشترک FAO و WHO وضع شده است.

Aflatoxin	Tolerance level (?g kg ⁻¹)	Food/ feed
B ₁	5	Feed for dairy cattle
M ₁	0.05	Milk
B ₁ + G ₁ + B ₂ + G ₂	15	Raw peanut for human consumption
B ₁ + G ₁ + B ₂ + G ₂	10	Processed peanut for human consumption

سم باید در تمام مدت فرایندهای بعد از درو، در صورتی که محصول تولید شده به مقدار زیاد مورد مصرف انسان و دام قرار گیرد، باید کنترل و تحت مدیریت خاص قرار داشته باشد (Lopez^b et al., 2001).

در اینجا به صورت تیتروار راه های مختلف جلوگیری از آلودگی قارچی محصولات غذایی و روش های مختلف غیر فعال کردن قارچ ها و سموم قارچی عنوان می شود و در ادامه به تفصیل به روش های مختلف سم زدایی آفاتوکسین در مواد غذایی اشاره خواهد شد :

۱) مدیریت پیش از برداشت:

- الف- مدیریت مقابله با تهاجم حشرات،
- ب- مدیریت باقی ماندن عامل در محصولات کشاورزی و چرخش عامل در چرخه محصول،
- ج- کشت و حالت خاک،
- د- پیشرفت در ایجاد واریته های مقاوم گیاهی،

۲) مدیریت برداشت:

شامل در نظر گرفتن مدت زمان درو، تمییز کردن و خشک کردن با توجه به موقعیت جغرافیایی

۳) مدیریت بعد از برداشت:

شامل روش های مختلف فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی ذیل :

۱-۳) روش های فیزیکی :

الف- گرمادهی و اشعه دهی

ب- استفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند سلنیوم، ویتامین هایی مانند آ، ای، سی

ج- استفاده از مواد افزودنی و ترکیبات غذایی مانند فروکتوز، ترکیبات فنلی، پیرین، کومارین ها، کلروفیل و مشتقات آن، آسپارتامین، سیپروهیتادین، گیاهان دارویی و عصاره های گیاهی.

د- عوامل باند شونده با مایکوتوکسین ها نظیر HSCAS (یک فیلوسیلیکات که از زئولیت طبیعی مشتق شده است)، زئولیت (یک آلومینوسیلیکات آبدار از قلیاها می باشد که دارای گروه کاتیونی آکالین است)، بنتوئیت ها) مواد جاذبی با یک ساختار میکروسکوپی به صورت لایه های کریستالی و با خاصیت تنوع در ترکیب)، خاک رس، کربن های فعال (AC)، کلستیرامین، پلی وینیل پیرولیدون، آلومین سرم گاو.

۲-۳) روش های بیولوژیکی:

نظیر استفاده از ساکارومایسس سرویسیه، فلاووباکتریوم آنوراننتیکوم، سودوموناس آیروزینوزا، استریپتوکوکوس سالیواریوس زیرگونه ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس دلیروکی زیرگونه بولگاریکوس، بیفیدیباکتریوم بیفیدیو.

۳-۳) روش های شیمیایی :

الف- عوامل کلرینه کننده مانند کلریت سدیم،

ب- عوامل اکسید کننده شامل پراکسید هیدروژن، ازن، بی سولفیت سدیم،

ج- عوامل هیدرولیتیک شامل آمونیاک، هیدروکسید کلسیم، متیل آمین و انواع اسیدها،

محلول هایی نظیر دی متیل آمین هیدروکلراید ۵٪، آلدئیدها (فرمالدئید)، پراکسید بنزئیل، ید، سولفات آهن آمونیاکی، پرمنگنات سدیم و... به مقدار قابل توجهی آفاتوکسین ها را از بین می برد (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶).

۱-۳-۲ : روش های مدیریتی و متدهای غیر فعال سازی آفاتوکسین ها در مواد غذایی دام و انسان :

قبل از اعمال روش های مختلف شیمیایی، بیولوژیک یا فیزیکی جهت تخریب و غیر فعال نمودن آفاتوکسین ها در مواد غذایی، ضروریست با اعمال روش های مدیریتی پیشگیرانه، از حضور عوامل اصلی تولید کننده توکسین و رشد آنها در محصولات اولیه غذایی جلوگیری کنیم. در ذیل در ابتدا به

روش های مختلف مدیریتی اشاره می شود و در ادامه به روش های مختلف غیرفعال نمودن آفاتوکسین ها اشاره خواهد شد.

۱-۲-۳-۱ : روش های مدیریتی جلوگیری از حضور آفاتوکسین :

۱-۱-۲-۳-۱ : مدیریت پیش از برداشت :

کنترل پیش از درو اولین قدم در اطمینان از بی خطر شدن محصول نهایی است. در حالی که ارتباط بین آلودگی مایکوتوکسینی و حالت های بد و نامناسب ذخیره سازی از مدت ها قبل شناخته شده است، یک سری مطالعات جدید، آلودگی برخی دانه ها در معرض مایکوتوکسین ها را در سطح مزرعه نشان می دهد. در مدت دوره رشد، دانه ها در معرض فاکتورهای محیطی مانند باد قرار دارند که کنترل آن غیر ممکن است. زمانی که محصولات کشاورزی در سطح مزرعه آلوده می شوند، رشد قارچی در طول مدت مراحل بعد از درو و ذخیره سازی ادامه می یابد. برخی استراتژی های متداول در مدیریت قبل از درو، کنترل فاکتورهای مخربی است که نشان داده شده، تولید مایکوتوکسین ها را افزایش می دهند. برخی استراتژی های متداول در مدیریت پیش از درو عبارتند از :

۱-۱-۲-۳-۱ : مدیریت مقابله با تهاجم حشرات :

اگرچه گزارش شده است که این آسیب در تشکیل آفاتوکسین ضروری و لازم نیست، ولی شیوع آسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازایتیکوس معمولاً در مواقع آسیب به هسته دانه ها زیاد می شود. آسیب حشرات به دانه ها منشأ اولیه برای این آلودگی می باشد و احتمالاً سطوح خشکی و رطوبت ایجاد شده برای رشد آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفاتوکسین نسبت به دیگر قارچ ها مساعدتر می باشد. کنترل تهاجم حشرات امکان پذیر است. بنابراین کنترل در جلوگیری از تکثیر آسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازایتیکوس و در ادامه ممانعت از تولید آفاتوکسین می تواند مؤثر باشد (Lopez^a et al., 2001).

۱-۱-۲-۳-۱ : مدیریت باقی ماندن عامل در محصولات کشاورزی و چرخش عامل در چرخه محصول :

توانایی باقی ماندن عامل در محیط ایجادکننده آلودگی یک عامل مهم در تولید آفاتوکسین و گسترش آلودگی آسپرژیلوسی است. حالت و فرم خاک به مقدار زیادی در توانایی زنده نگه داشتن و فعالیت اسپورها دارای اهمیت است و یک فاکتور مهم در تولید آفاتوکسین ها می باشد. وقتی محصولات کشاورزی، درو می شوند، برخی از بقایای این مواد در سطح مزرعه باقی می ماندند و آلودگی بعدی را در محصولات کشاورزی آینده ایجاد می کنند. مدیریت صحیح باقیماندن های مواد غذایی به طور واضح این مشکل را حل می کند (Lopez^a et al., 2001).

۱-۱-۲-۳-۱ : کشت و حالت خاک :

مشخص شده است که باروری خاک و استرس خشکسالی، از فاکتورهای مستعدکننده برای آلودگی پیش از درو ذرت به آفاتوکسین باشد. رطوبت و درجه حرارت نقش مهمی را باید در طراحی هر استراتژی برای رشد قارچی ایفاء کنند. رطوبت بالا و نمناکی نسبتاً بالا برای تقسیم اسپور و تکثیر قارچی نسبتاً ضروری است. بنابراین تلاش کافی در هنگام ظهور حالات افراطی مانند خشکسالی و رطوبت بالا انجام گیرد. بعضی مطالعات نشان می دهد که استرس خشکسالی به دنبال حالت رطوبت بالا یک حالت ایده آل برای تکثیر فوزاریوم مونیلیفوروم و تولید فومونیزین است. وقتی این فرم از حالت های آب و هوایی ظاهر می شود، باید در نظر داشته باشیم که برخی از درجات آلودگی

مایکوتوکسینی رخ خواهد داد و دیگر استراتژی های مدیریتی برای مقابله با این حالات باید در نظر گرفته شود (Lopez ^a et al., 2001).

۱-۳-۲-۱ : پیشرفت در ایجاد واریته های مقاوم گیاهی :

امروزه مطالعات و تحقیقات زیادی برای توسعه مقاومت طبیعی واریته های گیاهی در برابر آلودگی های قارچی انجام می گیرد. مقاومت میزبان می تواند یک استراتژی مناسب برای جلوگیری از آلودگی مایکوتوکسینی پیش از درو باشد. تا سال های اخیر مطالعه برای یافتن ژنوتیپ هایی از ذرت با مقاومت طبیعی موفقیت آمیز نبوده است. هر چند در مدت تست وسیع در مزارع آزمایشی، جمعیتی از ذرت های ایجاد شده مقاوم به آفلاتوکسین شناسایی گردید. از مطالعات ژنتیکی بر روی جمعیت این ذرت های خاص در سال های بعدی، اطلاعات زیادی در مورد توسعه لاین ها به دست آمد. مطالعات کروموزومی، ناحیه های مربوط به مقاومت در برابر آفلاتوکسین را مشخص کرده است. این لاین های به دست آمده در تحقیقات، هدف خوبی برای کنترل و پیشگیری پیش از درو، تشکیل مایکوتوکسین در سال های بعدی می باشد. از مهندسی ژنتیک برای توسعه در مورد میزبان های مقاوم استفاده می شود و به کمک آن ها ژن های ضد قارچ زیادی یافت شده است. بیشتر ترکیبات داخلی گیاه با وزن مولکولی کم و همچنین بیوماکرومولکول های زیادی در بافت های هسته یافت شده است که جزو ترکیبات ضدقارچی می باشند. افزایش تولید این ترکیبات ممکن است سمیت های جدیدی همراه با این ترکیبات ضد قارچی ظاهر کند (Lopez ^a et al., 2001).

۱-۳-۲-۲ : مدیریت برداشت :

در طول مدت درو، فاکتورهایی مثل مدت زمان درو، تمییز کردن و خشک کردن محصول کشاورزی اهمیت زیادی دارد. همچنین کنترل برای جلوگیری از تشکیل مایکوتوکسین در مدت زمان ذخیره سازی نیز مهم است. مطالعات نشان می دهد که زمان درو، بیشترین تأثیر و نقش را در تولید مایکوتوکسین دارد. در برخی نواحی جغرافیایی، زمان کشت باید موقعی انتخاب شود که دوره های باران شدید، مشکلی ایجاد نکند. به محض این که محصول به حداکثر رشد خود رسید و چرخه محصول نیز کامل شد، درو کردن باید انجام گیرد. محصولاتی که برای مدت دوره طولانی در مزرعه باقی می مانند، در آن ها ممکن است سطوح بالایی از آلودگی سمی دیده شود. خشک کردن کافی نیز همچنین برای جلوگیری از تکثیر قارچ ها در طول مدت ذخیره سازی، لازم است (Lopez ^a et al., 2001).

۱-۳-۲-۳ : مدیریت بعد از برداشت :

در برخی از مواقع با این که اقدامات عنوان شده، انجام می گیرد، ولی با این حال آلودگی اتفاق می افتد. بعد از درو، در صورت وجود آلودگی باید تدابیر خاصی برای محصولات آلوده در نظر گرفت که تا حدودی در از بین بردن این آلودگی ها مؤثر می باشد. برخی از روش های قدیمی خوب نیز برای جدا کردن فیزیکی سموم یا برای غیر فعال کردن شیمیایی آن ها بیان شده است که نتایج مثبتی دارد. البته باید توجه داشت که این روش های فراوری باید برای انواع ویژه ای از سموم موجود در یک سیستم ارزیابی شود (Lopez ^a et al., 2001, Galvano & Andrea., 2001).

۱-۳-۲-۴ : متدهای غیر فعال سازی آفلاتوکسین ها :

با وجود تمام مسایل عنوان شده، در اغلب اوقات به دلیل عدم مدیریت مطلوب، آلودگی اجتناب ناپذیر است و هنوز مشکلات جدی در رابطه با بسیاری از کالاهای کشاورزی موجود می باشد که این موضوع بر لزوم یک فرایند مفید جهت غیر فعال کردن توکسین ها تأکید می کند. به علاوه برای قابل اجرا بودن یک فرایند جهت کاهش توکسین تا مقادیر ایمن، باید نیازهای ذیل را مدنظر داشت:

- ۱- این فرایند نباید منجر به به تشکیل سایر مواد توکسیک و یا هر گونه باقی مانده مضر شود که ممکن است ایمنی کلی محصول تیمار شده را کاهش دهد،
 - ۲- کیفیت تغذیه ای محصول نباید کاهش یابد،
 - ۳- نباید اثرات مضر روی ویژگی های فیزیکی و حسی محصول داشته باشد،
 - ۴- باید از نظر اقتصادی قابل اجرا و از نظر تکنیکی عملی باشد،
 - ۵- باید قادر به تخریب اسپورها و میسلیم های مولد آفاتوکسین (اگر در محصول وجود دارند) باشد. چون ممکن است در شرایط مطلوب تکثیر کرده و تولید توکسین نماید.
- توانایی چندین روش برای غیر فعال کردن آفاتوکسین در غذاهای انسانی و دامی آلوده شده، مورد بررسی قرار گرفته اند. هدف این روش ها حذف توکسین از غذاهای انسانی و دامی یا تخریب آن در غذا می باشد. آن ها را می توان به روش های شیمیایی، بیولوژیک و فیزیکی طبقه بندی نمود.

۱-۲-۲-۳-۱ : روش های شیمیایی :

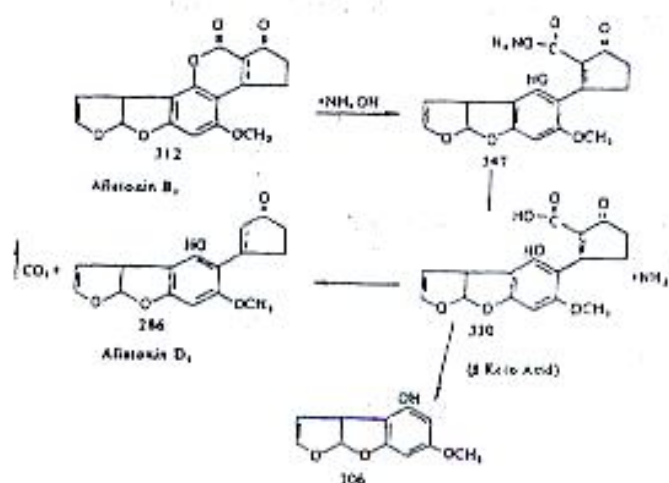
مواد شیمیایی بسیاری می توانند با آفاتوکسین ها واکنش داده و آنها را به ترکیبات با خواص توکسیک و موتاژنیک کمتر، تبدیل کنند. این مواد شامل اسیدها، بازها، عوامل اکسیدکننده، بی سولفیت ها و گازها می باشند. به هر حال بسیاری از روش های شیمیایی که مورد بررسی قرار گرفته اند، غیر عملی (انجام تحت شرایط شدید دما و فشار)، غیر ایمن (تشکیل باقیمانده های توکسیک) و نامطلوب (افت ویژگی های تغذیه ای، حسی و فاکشنال محصول) می باشند. به طور معمول آمونیشن (Ammoniation) و تیمار با بی سولفیت سدیم، مهمترین فرایندهای صنعتی شیمیایی هستند که به طور گسترده ای برای غیرفعال کردن پودر محصولاتی چون بادام زمینی، ذرت و پنبه دانه، که برای تهیه غذاهای دامی استفاده می شوند، به کار می روند.

۱-۲-۲-۳-۱ : تیمار با آمونیاک (Treatment with Ammonia)

تیمار با آمونیاک در فاز گازی، در محلول یا همراه موادی که قابلیت رهاسازی آن را دارند، اپتیموم نتایج را در دتوکسیفیه نمودن بادام زمینی، پنبه دانه و آرد ذرت می دهد. مؤثر بودن دتوکسیفیه کردن با آمونیاک به طور مثبتی با مقدار مورد استفاده، زمان واکنش، دما و مقادیر فشار و ترکیب شدن با فرمالدئید وابستگی دارد. اگر ساختار مولکولی AFB_1 به مدت کافی در معرض آمونیاک قرار بگیرد، به طور برگشت ناپذیری تغییر می کند. در عوض اگر در معرض قرارگیری به مدت کافی ادامه نیابد، مولکول می تواند به حالت اولیه خود برگردد. در گاوهای شیری که با غذاهای تیمار شده با آمونیاک تغذیه شده بودند، درصد حذف متابولیت AFB_1 در شیر (یعنی آفاتوکسین M_1 یا AFM_1) را بین ۱۰ تا ۲۰ درصد در مقایسه با AFB_1 خورده شده، نشان دادند. مرحله اول واکنش (قابل برگشت) شامل باز شدن حلقه لاکتون آفاتوکسین است (شکل ۱-۲-۳). در یک محیط اسیدی مانند معده، ممکن است تعادل به سمت فرآورده های اولیه و در نتیجه تشکیل مجدد AFB_1 میل کند. در این مورد در مقایسه با مقادیر به دست آمده از آنالیز مقادیر بیشتری توکسین را بلعیده است، که درصد بالاتر AFM_1 در شیر را توجیه می کند.

آفاتوکسین D_1 یکی از فرآورده های معروف ناشی از دخالت در واکنش دتوکسیفیه کردن است که به عنوان یک فنل غیرفلورسنت با وزن مولکولی ۲۸۶ شناخته شده که عدم حضور الکترون کربونیلی فاکشنال را نسبت به مولکول AFB_1 آشکار می نماید. (شکل ۱-۳-۱) علاوه بر مسیری که منجر به تشکیل AFD_1 می شود، واکنش می تواند به طور آلترناتیو دنبال شود که می تواند موجب تشکیل سایر ترکیبات شامل ترکیبات غیر مشخص با وزن مولکولی کمتر از ۲۰۰ دالتون، یک فنل دی فوران غیر فلورسنت با وزن مولکولی ۲۰۶ دالتون که پس از تشکیل β کتواسید حاصل می شود، یک ترکیب با وزن مولکولی ۲۵۶ دالتون که با تصعید AFD_1 در دماهای بین ۲۲۰ و ۳۴۰ درجه سلسیوس تشکیل

می شود، و یک ترکیب ناشناخته با وزن مولکولی ۲۳۶ دالتون که بعد از آزاد شدن یک مولکول CO₂ ایجاد می شود، می گردد. (Piva et al., 1995)



شکل ۱-۳-۱ : آمونیشن آفلاتوکسین

AFM₁ ، AFD₁ و ترکیب شیمیایی با وزن مولکولی ۲۰۶ دالتون، از نظر بیولوژیکی به منظور تخمین باقیمانده توکسیسیته و پتانسیل موتاژنیک آزمایش شدند. آزمایش ها با استفاده از میکروزوم های سالمونلا، ایندکس باند کووالانت و رشد جنین مرغ نشان داد که AFD₁ بسیار کمتر از AFB₁ توکسیک است که ضریب این کاهش در تجربه های متفاوت از ۲ تا ۴۵۰ متنوع بوده است. در عوض توکسیسیته و پتانسیل موتاژنیک AFM₁ طبق آزمایشات انجام شده روی اردک، موش رات (Rat) و ماهی قزل آلا رنگین کمان، مشابه مولکول اولیه بود. در حالی که به نظر می رسد که پتانسیل موتاژنیک روی کلیه های موش رات کاهش یافته است. مطالعات انجام شده روی جوجه های گوشتی، مرغ های تخم گذار و رات که با غذاهای آلوده به AFB₁ آمونیاکی شده، تغذیه شدند، هیچ تغییرات هیستولوژیکی در ارگان های هدف نشان نداد. در مطالعه روی گاوهای شیری تقریباً محوشدن انتقال AFB₁ به شیر نشان داده شد. (مقدار AFM₁ زیر ۱ g/l ؟ ۰/۱ بود.)

معایب تیمار با آمونیاک اغلب در ارتباط با ساخت کارخانجات ویژه می باشد. زیرا آمونیاک باعث خوردگی فلزات می گردد و در مخلوط بیش از ۱۵ % (حجم) در هوا قابلیت انفجار دارد. به علاوه از برخی اثرات روی ویژگی های شیمیایی و کیفی غذاهای دامی نمی توان چشم پوشی کرد. این تغییرات شامل موارد ذیل است :

- ۱- رنگ قهوه ای ناخواسته در غذای دامی تیمار شده،
- ۲- افزایش مقدار نیتروژن تام (Total Nitrogen) و نیتروژن غیرپروتئینی (NPN) همراه با کاهشی مشخص در حلالیت نیتروژن ،
- ۳- کم شدن مقدار برخی از اسیدهای آمینه (سیستین، متیونین و به ویژه لیزین) (Piva et al., 1995)

۲-۱-۲-۲-۳-۱ : تیمار با بی سولفیت سدیم (Treatment with Sodium Bisulfite)
تیمار با بی سولفیت سدیم یک استراتژی معتبر برای دتوکسیفیکاسیون AFB₁ است. گرچه کمتر از دتوکسیفیکاسیون با آمونیاک مؤثر است، ولی برخی از معایب تیپیک روش آمونیاک را ندارد. همچنین بسیار کم هزینه تر است. به علاوه بی سولفیت سدیم قبلاً هم به طور معمول به غذاها و نوشیدنی هایی

از قبیل شراب، آب میوه ها، مرباها و میوه جات خشک شده، افزوده می شد که به عنوان یک مهارکننده دژنراسیون آنزیمی، یک آنتی اکسیدان و عامل باکتریوستات عمل می کند. فراورده اصلی واکنش به عنوان یک سولفونات جداسازی و شناسایی شده است، که ۱۵- آلفاسولفونات یا آفلاتوکسین B₁S، نامگذاری شده که به وسیله الحاق NaHSO₃ در باند دوگانه حلقه فورفوران تشکیل شده و مولکول AFB₁ را از جایگاه اصلی واکنش مولکول DNA محروم می کند و بنابراین پتانسیل موتاژنی را کاهش می دهد.



در این مورد در ارتباط با مکانیسم اثر AFB₁ در بدن لازم به توضیح است که AFB₁ در بدن برخی از حیوانات تولید اپوکسید AFB₁ می نماید که اگر در بدن آنزیم هیدروکسیلاز موجود باشد، آن را تجزیه کرده و به هیدروکسی استات تبدیل می کند و این ماده اخیر با دنباله های اسید آمینه لیزین واکنش داده و ایجاد اختلال می کند. اما اگر آنزیم هیدروکسیلاز موجود نباشد، اپوکسید AFB₁ تجزیه نشده با دنباله های گوانین، در برخی از نقاط خاص مولکول DNA واکنش می دهد که یکی از این نقاط کدون ۲۴۹ مربوط به ژن P53 است و از این طریق اثر سرطانزایی خود را اعمال می کند. ویروس هپاتیت B نیز با مکانیسم دیگری روی ژن P53 اثر می گذارد و می توان گفت که ویروس هپاتیت B و AFB₁ سینرژیست هستند.

(Piva et al., 1995)

۳-۱-۲-۲-۳-۱ : تیمار با هیدروکسید کلسیم :

مشخص شده که هیدروکسید کلسیم قادر است مقدار آلودگی را زمانی که به تنهایی یا در ترکیبی همراه با فرمالدئید مصرف شود، کاهش دهد. یک آزمایش روی پودر بادام زمینی نشان داد که استفاده این دو ماده با هم تأثیر دتوکسیفیکاسیون AFB₁ را افزایش می دهد. افزایش اثر هیدروکسید کلسیم ترکیب شده با فرمالدئید به صورت آزمایش های invitro و در گاوهای شیری تأیید شده است. نتایج رضایت بخشی نیز در رابطه با مونومتیل آمین مشاهده شده است. برخی از محققین اثر نیکستامالیزاسیون (Nixtamalization) را مطالعه کرده اند که کاری سنتی بوده که به طور گسترده ای توسط مردمان آمریکای جنوبی برای تهیه نان های ذرت مکزیکی توسط پختن ذرت در آب جوش حاوی هیدروکسید کلسیم انجام می شود. این روش تیمار به دتوکسیفیه شدن آرد ذرت منجر می شود، حتی اگر به مقادیر ایمن برای مصرف انسانی نرسد. دزهای بالاتر هیدروکسید کلسیم ویژگی های ارگانولپتیک را کاهش می دهد، اما نتایج رضایت بخشی را درباره آفلاتوکسین های G₁ و G₂ می دهد.

در حالی که آفلاتوکسین B₂ و به ویژه آفلاتوکسین B₁ بیشتر پایدار بوده اند. (Piva et al., 1995) اعتبار روش پختن در هیدروکسید کلسیم در دزهای بالا تأیید شده است که به طور متناسب افزایش مقدار تخریب AFB₁ تا ۴۶ % را نشان می دهد. گرچه برخی مطالعات نیز برگشت پذیری واکنش را در محیط اسیدی و پتانسیل موتاژنی بزرگتر محصول واکنش را در مقایسه با مولکول اولیه نشان داده اند. از چگونگی واکنش شیمیایی خنثی سازی تنها اطلاعات مبهمی در دسترس است. هر چند تیمار با هیدروکسید سدیم، پتاسیم یا کلسیم مشخص شده که به طور ناچیزی درصد دتوکسیفیه شدن کمتری نسبت به تیمار با آمونیاک دارند. اما مزیت هایی نیز دارا می باشند:

- ۱- هزینه کم هیدروکسید کلسیم ارزانترین ماده قلیایی است و در لیست مواد معدنی و فراورده های شیمیایی صنعتی که ممکن است در غذای دام ها استفاده شوند، قرار دارد.
- ۲- کاربرد آسان : این ماده به صورت یک پودر است که می تواند به صورت آماده جهت دتوکسیفیه کردن، با غذای دام مخلوط شود. به علاوه ساختن کارخانجات ویژه با استفاده از تکنولوژی پیشرفته نیاز ندارد. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۴: تیمار با فرمالدئید

فرمالدئید ترکیبی است که به طور ملایم در خنثی سازی مولکول AFB_1 مؤثر است. با آنکه اگر اطلاعاتی در مورد مکانیسم واکنش های آن در دسترس نیست. مطالعات اثر افزایشی آن را در ارتباط با آمونیاک و هیدروکسید کلسیم نشان داده اند. در نمونه های شیر آلوده افزودن ۰/۵ درصد فرمالدئید، AFM_1 را از ۱/۱ به ۰/۰۵ میکروگرم کاهش داد.

۱-۳-۲-۲-۳: سایر تیمارها: سایر مواردی که به نظر می رسد علیه آفلاتوکسین فعال باشند، شامل برخی اکسیدان ها از قبیل هیپوکلریت سدیم، پرمنگنات پتاسیم، پراکسید ئیدروژن و بورات سدیم هستند که مطالعات با اهمیتی در مورد این تیمارها متمرکز نشده اند. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۳: روش های بیولوژیکی:

میکروارگانیزم های بسیاری شامل باکتری ها و کپک های مولد اسید می توانند آفلاتوکسین را متابولیزه و غیرفعال سازند. ساکارومایسس سرویسیه ۱۰۲۶ (*Saccaromyces cerevisiae* 1026) در آغاز به عنوان یک پروموتور در سال ۱۹۹۰ مورد استفاده قرار گرفت. این عامل تأثیرات مفیدی از جمله کسب وزن، ایجاد پاسخ ایمنی در جوجه هایی که در معرض AFB_1 بودند، داشتند. در محیط آزمایشگاهی مطالعات نشان داد که AFB_1 با ساکارومایسس سرویسیه به میزان ۷۷% باند می شود. گفته شده است که مانانولیگوساکارید (*Mannanoligo saccharide*) که از دیواره سلولی ساکارومایسس سرویسیه مشتق می شود، به طور قابل ملاحظه ای ظرفیت باند شدن آن با میکوتوکسین ها را افزایش می دهد. (AFB_1 حدود ۹۵%) (Lopez^a et al., 2001)

همچنین می توان از فلاوباکتریوم اورانتیاکوم (*Flavobacterium aurantiancum*) به عنوان فعالترین ارگانیزم در کاهش AFB_1 نام برد. به طور منطقی این طور نتیجه گرفته شده که غیرفعال شدن در نتیجه تولید اسید و متعاقب آن تبدیل AFB_1 به AFB_{2a} است که از نظر موتاژنیک بودن، ۱۰۰۰ برابر کمتر از توکسین اولیه است. البته مطالعات نشان می دهد که حضور یون های فلزی دوظرفیتی مانند مس، منگنز، روی و کبالت به صورت بسیار قوی از خاصیت باند شدن فلاوباکتریوم اورانتیاکوم جلوگیری کنند.

اخیراً برخی سویه های شیری باکتری های اسیدلاکتیک یافت شده اند که توانایی دفع AFB_1 را در محیط کشت دارند، که دربرگیرنده یک فرایند سریع شامل دفع ۸۰% از AFB_1 به صورت تماس فوری بدون انکوباسیون بعدی است. گفته شده است که توانایی باکتری ها در دفع AFB_1 به ساختار دیواره سلولی آن ها وابسته است. (Lopez^a et al., 2001)

۱-۳-۲-۲-۳: روش های فیزیکی:

غیرفعال سازی توسط روش های فیزیکی شامل استخراج توسط حلال، جذب سطحی، غیرفعال سازی توسط گرما و پرتودهی می باشد که در ذیل به تفصیل مورد بحث قرار می گیرد.

۱-۳-۲-۲-۳-۱: استخراج (Extraction):

استخراج با حلال ها برای حذف آفلاتوکسین ها از دانه های روغنی بادام زمینی و پنبه دانه مورد استفاده قرار گرفته است. مواد تیمار شده با این روش تنها ممکن است برای مصرف خوراک حیوانات مناسب باشد. حلال های مورد استفاده شامل اتانول ۸۵%، محلول آبی استون ۹۰%، ایزوپروپانول ۸۰%، هگزان-متانول، متانول-آب، استونیتریت-آب، هگزان-اتانول-آب و استون-هگزان-آب می باشند. نسبت حلال به نمونه (Solvent: sample) برای بازیافت توکسین بسیار مهم است. استخراج حلال می تواند تمام مقادیر ناچیز آفلاتوکسین را از پودر دانه های روغنی حذف کند، بدون اینکه هیچ محصول فرعی توکسیک تشکیل گردد یا کمیت و کیفیت پروتئینی کاهش یابد. به هر حال استفاده از این

تکنیک در مقیاس وسیع به علت هزینه بالا و مشکلات مربوط به استخراج کننده های توکسیک، محدود می شود. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۳: جذب سطحی (Adsorption):

برخی مواد جاذب می توانند با آفاتوکسین ها باند شده و بنابراین آن ها را از محلول های آبی حذف کنند. خاک رس بنتونیت (Bentonite clay) آفاتوکسین B₁ را از محلول بافر سورنسن (Sorensen)

در دمای ۳۰ درجه سلسیوس جذب می کند. جداسازی خاک رس حذف ۹۴ تا ۱۰۰% توکسین را از محلول باعث می شود. کاهش اندازه ذرات و دادن یک حرارت اولیه به خاک رس توانایی جذب و نگهداری توکسین را افزایش می دهد. همچنین ۶۵ تا ۷۹% از AFM₁ را از شیر حذف کرده است. آلومینوسیلیکات سدیم کلسیم هیدراته (HSCAS: Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate) گزارش شده که پیوستگی بالایی برای AFB₁ دارد. HSCAS بیش از ۸۰% توکسین را از محلول حذف می کند. مطالعات invitro نقش HSCAS را در پیشگیری موتاژنیسیته و توکسیسیته AFB₁ نشان داده است.

برخی مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که مواد جاذب قابل کلسیفیه شدن از جمله آلومیناها (aluminas)، سیلیکاها (silicas) و آلومینوسیلیکات ها قادر به باند شدن با آفاتوکسین در محلول هستند. استخراج با استفاده از حلال های مختلف در دماها و pH های گوناگون یک آذاسازی را نشان می دهد که در شدت عملکرد نوع ماده به کاررفته، متفاوت بودند. مولکول AFB₁ ممکن است به راحتی در داخل ساختمان تیپیک ترکیب طبقه طبقه-مشبک HSCAS به طور محبوس بماند. گرچه پایداری این جذب در شرایط pH خاص، مانند آنچه در معده است، باید متفاوت باشد. تحقیقات روی مرغ، بوقلمون و خوک تغذیه شده با غذاهای آلوده به AFB₁ که به آن HSCAS افزوده شده بود، عدم حضور یا کاهش پدیده های intoxication مثل افزایش تناسب وزن ارگان های حیاتی، کاهش در وزن بدن یا کاهش در افزایش وزن بدن، استخوان های شکننده و انباشته شدن متابولیت ها در بافت ها را نشان داد.

برخی محققین نتایج موفقیت آمیزی با افزودن HSCAS به غذای الوده بره های در حال رشد، گرفته اند. همین محققان یک آزمایش دتوکسیفیکاسیون را با افزودن HSCAS به غذای گاوهای شیری که با سطح آلودگی AFB₁ به میزان ۲۰۰۰ میکروگرم به کیلوگرم، انجام دادند و کاهشی قابل توجه در انتقال آفاتوکسین به شیر به دست آوردند و تأیید تیمار حتی در مقادیر پایین آلودگی به طور مکرر و در عمل ثابت شد. (Piva et al., 1995)

تحقیقات دتوکسیفیه کردن مشابهی با استفاده از زئولیت ها، بنتونیت ها و فیلوآمینوسیلیکات های اصلاح شده (Modified phylloaminosilicates) انجام شده است. یک زئولیت پودر شده به عنوان یک ماده جاذب آفاتوکسین در غذای دام جهت از شیر گرفتن توله خوک ها، آزمایش شد و کاهش مشخص در میزان مرگ و میر و افزایش در مصرف غذا و وزن بدن ایجاد نمود. در مقابل مطالعه ای روی گاوهای شیری عمل و اثر کاهنده زئولیت را روی انتقال آفاتوکسین به شیر مشخص نکرد. در حالی که آزمایشی روی جوجه های گوشتی نشان داد که افزودن زئولیت هیچ اثر مفیدی ندارد. این اطلاعات متضاد، می توانند به روش های آزمایش متفاوت و نیز به نوع زئولیت مورد استفاده نسبت داده شوند. در حقیقت در زئولیت های سنتتیک، بر خلاف نوع طبیعی، توزیع اندازه سوراخ ها خیلی کم تغییر می کند و معمولاً در یک محدوده باریک قطر قرار دارند. اگر اندازه سوراخ ها با اندازه مولکول های آفاتوکسین جور باشند، جذب سطحی به طور آشکاری انجام می شود. برعکس جذب می تواند صفر باشد. زیرا سوراخ های با اندازه متوسط وجود ندارد. (Piva et al., 1995)

آزمایشی روی بنتونیت به عنوان ماده جاذب آفاتوکسین در گاوهای شیری، صورت گرفت که کاهش ۳۳ درصدی انتقال به شیر را نشان داد. در حالی که مطالعات آزمایشگاهی روی غذای ماهی قزل آلا رنگین کمان به جذب ۷۰ درصدی آفاتوکسین B_1 حاضر در غذا، دست یافت. یک تحقیق آزمایشگاهی دیگر، اثر یک فراورده تجاری به نام Mycobond که از ترکیب شدن شیمیایی فیلوآمینوسیلیکات اصلاح شده با مونتوریلونیت (Montmorillonite) چندلایه ساخته می شود، را با تشکیل یک کمپلکس پایدار خنثی که می تواند مانع جذب آفاتوکسین در روده شود، را مشخص ساخت. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۳-۳: حرارت (Heat) :

برای تغییر ساختار آفاتوکسین رنج دمایی بالایی از ۲۳۷ تا ۳۰۶ درجه سلسیوس نیاز است. آفاتوکسین B_1 جامد نسبت به خشک شدن در دماهای پایین تر از دمای تغییر ساختار آن یعنی ۲۶۷ درجه سلسیوس کاملاً پایدار است. شرایط معمولی پخت خانگی از قبیل آب پز کردن و سرخ کردن (تقریباً 150°C) برای تخریب AFB_1 و AFG_1 در حالت جامد، ناموفق است. جدول ۱-۳-۴ نتایج برخی مطالعات را در ارتباط با تقلیل آفاتوکسین در غذا با استفاده از دماهای مختلف، خلاصه کرده است. دمای بالای 150°C برای دستیابی به تخریب بالقوه توکسین لازم است. وسعت تخریب حاصل شده به مقدار اولیه آلودگی، میزان دمای استفاده شده و زمان، بسیار وابسته است. به علاوه نوع غذا و آفاتوکسین نیز بر میزان غیرفعال شدن مؤثر است. همچنین تقلیل آفاتوکسین توسط حرارت تابع میزان رطوبت، pH و قدرت یونی غذا می باشد. میزان رطوبت یک فاکتور بحرانی است. غذاهای آلوده ای که مقدار رطوبت بیشتری دارند، راحت تر توسط حرارت غیرفعال می شوند. در مطالعه ای با حرارت دادن پودر پنبه دانه حاوی ۳۰٪ رطوبت در 100°C برای مدت یک ساعت، ۷۴/۸٪ آفاتوکسین های موجود ($B_1 + B_2$) تقلیل یافت. در حالی که پس از حرارت دادن یک پودر مشابه حاوی ۶/۶٪ رطوبت تحت شرایط یکسان، تنها ۳۲/۷٪ توکسین ها تخریب شدند. پیشنهاد شده است، که حضور آب به باز شدن حلقه لاکتون در AFB_1 (با افزودن یک مولکول آب به حلقه) برای تشکیل یک اسید کربوکسیلیک نهایی، کمک می کند. گروه اسیدی بعداً دستخوش دکربوکسیلاسیون القا شده توسط حرارت می شود. حضور نمک های یونی وسعت تقلیل آفاتوکسین توسط حرارت را افزایش داد. در مطالعه ای بادام زمینی های بدون پوسته خام را در محلول نمک طعام ۵٪ در یک اتوکلاو در دمای 116°C و فشار ۰/۷ بار برای ۳۰ دقیقه، پختند. این تیمار کل محتوای آفاتوکسین ها ($B_1 + G_1 + B_2 + G_2$) تا ۸۰ تا ۱۰۰٪ کاهش می دهد. حذف توکسین ها به افزودن نمک طعام در مقایسه با کنترل های بدون نمک، نسبت داده شده است. (Piva et al., 1995)

Ruston و همکارانش در ۱۹۹۳ اثر pH (۵، ۸ و ۱۰/۲)، دما (121°C ، 130°C و 140°C) و زمان حرارت دادن (۵ ثانیه، ۲۰ ثانیه و ۱۵ دقیقه) را روی فعالیت موتاژنیک (که با آزمون Ames ردیابی می شد) شربت بادام زمینی که به صورت عمدی با AFB_1 آلوده شده بود، مطالعه کردند. تیمارهای حرارتی در $pH=8.0$ روی کاهش فعالیت موتاژنیک مؤثر نبود. از طرف دیگر تیمارهای 130°C درجه سلسیوس در $pH=10.2$ در ۲۰ ثانیه و 121°C درجه سلسیوس در $pH=10.2$ و ۱۵ دقیقه، فعالیت موتاژنیک را به ترتیب تا ۷۸٪ و ۸۸٪ کاهش دادند. غیرفعال شدن را به تغییر قسمتی از AFB_1 به AFD_1 از طریق هیدرولیز حلقه لاکتون در AFB_1 که توسط NaOH با استفاده از تنظیم pH کاتالیز شده، نسبت می دهند. خاصیت موتاژنیک AFD_1 ۴۵۰ برابر کمتر از AFB_1 است. تیمارهای $pH=5.0$ در 130°C درجه سلسیوس در ۲۰ ثانیه و $pH=5.0$ در 121°C درجه سلسیوس در ۱۵ دقیقه، فعالیت موتاژنیک را به ترتیب تا ۷۶٪ و ۷۳٪ کاهش می دهند. غیرفعال شدن را به هیدراسیون قسمتی از AFB_1 در حلقه فوران انتهایی به AFB_{2a} که توسط HCl با استفاده از تنظیم pH کاتالیز شده، نسبت دادند. AFB_{2a} خاصیت موتاژنیک ۱۰۰۰ بار کمتر از AFB_1 دارد. تغییر pH از

۸ تا ۵ یا ۱۰/۲ بدون حرارت دادن کاهش قابل توجهی در فعالیت موتازنیک ندارد که این مطلب بر نقش سینرژیک pH و حرارت در کاهش خاصیت موتازنیک، تأکید دارد.

حرارت دادن با ماکروویو، پتانسیل بالایی جهت تخریب آفلاتوکسین در بادام زمینی های آلوده را نشان داد که به میزان قدرت و زمان تیمار بستگی داشت. به عنوان مثال برشته کردن یک پودر بادام زمینی که به طور عمدی آلوده شده بود، در یک ماکروویو با قدرت ۶ kw برای مدت ۴ دقیقه، ۹۵٪ آفلاتوکسین را در پودر تخریب کرد. همچنین حرارت دادن با ماکروویو مقدار آفلاتوکسین را در مغزهای بادام زمینی، کاهش داد. در انرژی پایین تر (۰/۷ kw) در زمان ۸/۵ دقیقه، ۴۸ تا ۶۱٪ از AFB₁ را در مغزهای بادام زمینی که به طور عمدی آلوده شده بودند، کاهش داد. اگرچه در مطالعه ای دیگر تیمار مشابه تنها ۳۰ تا ۴۵٪ کاهش AFB₁ را در مغزهایی که به صورت طبیعی آلوده بودن، نشان داد. (Piva et al., 1995)

جدول ۱-۳-۴: تخریب آفلاتوکسین در مواد غذایی توسط تیمارهای مختلف حرارتی

Treatment	Food	Aflatoxin	Initial level (?g kg ⁻¹)	Destruction	Contamination ^a
Roasting:204°C	Peanuts	B ₁ , G ₁	253,186	52,41	N
Roasting:204°C	Peanuts	B ₁ , G ₁	346,286	41,51	N
Roasting:121°C,30 min	Peanuts	B ₁ , G ₁	2200,4100	84,85	A
Roasting:121°C,30 min	Peanuts	B ₁ , G ₁	90,150	73,76	A
Roasting:204°C,5 min	Peanuts	B ₁ , G ₁	90,150	69,64	A
Roasting:204°C,5 min	Peanuts	B ₁ , G ₁	2200,4100	69,64	A
Roasting:150°C,30 min	Peanuts	B ₁	370	48	N
Roasting:150°C,30 min	Peanuts	B ₁	317	47	A
Autoclave:116°C,0.7 bar,30 min, in 5% NaCl brine	Peanuts	Total ^b	5012-19992	80-100	A
Heating:200°C, 20 min	Olive oil	B ₁	100	25	A
Heating:250°C, 10 min	Olive oil	B ₁	100	65	A
Extraction:105°C	Corn	Total	500	40-70	N

^a N, natural; A, artificial

^b B₁ + G₁ + B₂ + G₂

۱-۳-۲-۲-۳-۴: پرتودهی (Irradiation):

پرتوها به دو گروه طبقه بندی می شوند: ۱- یونیزه کننده (یونیزان)، ۲- غیر یونیزه کننده (غیر یونیزان)

در پرتوهای یونیزان (مثل اشعه X، گاما و ماورای بنفش) تغییرات بالقوه ممکن است در مولکول های ماده پرتودیده همراه با کمی افزایش دما، ایجاد شود. تغییرات مولکولی ممکن است برای ارگانیزم های زنده که در معرض دزهای زیاد پرتو یونیزان قرار می گیرند، کاملاً مضر باشد. از طرف دیگر، پرتوهای غیر یونیزان (مثل امواج رادیویی، مایکروویو، امواج مادون قرمز و نور مرئی) با شدت کافی منجر به افزایش دما می شود که معمولاً همراه با تغییرات مولکولی است که برای انسان مخاطره آمیز نیستند. استفاده از پرتوهای یونیزان برای پاکسازی غذاها از میکروارگانیزم های پاتوژن، از روش های مورد استفاده برای حفاظت و نگهداری مواد غذایی است. علیرغم بحث های موجود در مورد ایمن بودن غذاهای پرتودیده در رابطه با سلامتی انسان، به هر حال پرتودهی غذا کاربرد بالقوه ای در مقیاس تجاری برای ارائه فرآورده های غذایی استریل دارد.

۱-۳-۲-۲-۳-۱ : اشعه ماورای بنفش (Ultraviolet light) :

آفلاتوکسین به پرتو UV حساس است. AFB₁ نور UV را در طیف های ۲۲۲، ۲۶۵ و ۳۶۲ نانومتر (با حداکثر جذب در طیف ۳۶۲ نانومتر) جذب می نماید که ممکن است منجر به تشکیل تا ۱۲ فراورده تجزیه شده در اثر نور شود. AFB₁ و AFG₁ وقتی که در معرض نور UV (۳۶۵ نانومتر به مدت یک ساعت) روی پلیت های سلیکاژل TLC قرار گرفتند، دستخوش یکسری تغییرات فتوشیمیایی شدند. محصولات فتودگرادیشن برای جنین های مرغ نسبت به توکسین های اولیه کمتر توکسیک بودند.

تیمار روغن بادام زمینی با UV به مدت ۲ ساعت، ۴۰ تا ۴۵ % آفلاتوکسین های موجود در روغن را از بین می برد. در شیری که به طور عمدی آلوده شده، به وسیله نور UV، ۳/۶ تا ۱۰۰ % از آفلاتوکسین M₁ بسته به زمان در معرض قرار گیری، غیرفعال شده است. (۲ تا ۶۰ دقیقه) همچنین افزودن پراکسید هیدروژن (۱ %) به شیری که پرتو UV می بیند (به مدت ۱۰ دقیقه) به طور کامل (۱۰۰ %) AFB₁ را تخریب کرده است. تخریب AFB₁ در محلول های آبی توسط انرژی UV اولین واکنش کینتیک غیرقابل برگشت بود که آن را به باز شدن پیوند دوگانه در حلقه انتهایی AFB₁ نسبت دادند. همچنین پرتو دهی انجیرهای خشک که به طور عمدی با AFB₁ آلوده شده بودند (به میزان ۲۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) به مدت ۳۰ دقیقه، مقدار توکسین را تا ۴۵/۷ % کاهش داد. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۳-۲ : اشعه گاما (Gamma Rays) :

استفاده از اشعه گاما برای غیرفعال سازی آفلاتوکسین ها مورد بررسی قرار گرفته است. توکسیسیتی یک پودر بادام زمینی آلوده به AFB₁ پس از پرتو دهی با اشعه گاما با دزهای ۱ و ۱۰ کیلوگری، به ترتیب ۷۵ % و ۱۰۰ % کاهش یافت. گرچه دزهای بالاتر از ۱۰ کیلوگری جوانه زنی جوانه ها را مهار کرده و مقدار پرکساید روغن در بادام زمینی های پرتودیده با گاما را افزایش می دهد. حضور آب نقش مهمی در تخریب آفلاتوکسین توسط انرژی گاما دارد، زیرا رادیولیز آب منجر به تشکیل رادیکال های آزاد با واکنش دهی بالا می شود. این رادیکال ها می توانند به AFB₁ در حلقه فوران انتهایی حمله کرده و محصولاتی با فعالیت بیولوژیکی پایین تر ایجاد کنند. فعالیت موتاژنیک AFB₁ در یک محلول آبی (۵ میکروگرم بر میلی لیتر آب) پس از در معرض قرارگیری با اشعه گامای ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ کیلوگری به ترتیب تا ۳۴، ۴۴، ۷۴ و ۱۰۰ درصد کاهش یافت. همچنین در محلول دی متیل سولفوکساید-آب (به نسبت حجمی ۱ به ۹) یک دز ۱۰ کیلوگری به طور کامل (۱۰۰ %) AFB₁ را غیر فعال و ۹۵ % AFG₁ را تخریب کرد. افزودن یک میلی لیتر از پراکسید هیدروژن ۵ % به یک محلول آبی AFB₁ (۵۰ ?g/ml) افت ۳۷ تا ۱۰۰ % توکسین را در یک دز پایین (۲ کیلو گری) نتیجه داد. محصولات نهایی هیچ فعالیت بیولوژیکی را در آزمون موتاژنیستی Ames نشان ندادند. یک تیمار مشابه، مقدار AFB₁ در مغزهای بادام زمینی را تا ۷۳ الی ۸۰ درصد کاهش داد. (Piva et al., 1995)

۱-۳-۲-۲-۳-۳ : پرتو دهی خورشیدی (Solar Irradiation) :

انرژی خورشیدی نیز آفلاتوکسین ها را در برخی مواد غذایی تخریب می کند (جدول ۱-۳-۵). مطالعاتی در هندوستان در ارتباط با تأثیر نور خورشید بر تقلیل توکسین در فراورده های مختلف بادام زمینی انجام شده است. به نظر می رسد که اشعه UV در نور آفتاب نقش مهمی در تخریب نوری (Photo destruction) آفلاتوکسین، بازی می کند. پروتئین بادام زمینی می تواند با آفلاتوکسین ها باند شود و آفلاتوکسین های باند شده با پروتئین، نسبت به توکسین های آزاد حساسیت کمتری به تخریب با نور دارند. حدود ۹۰ % از AFB₁ در ورقه های بادام زمینی که عمدتاً آلوده شده بودند، توسط نور

آفتاب تخریب شد. در حالی که با یک تیمار مشابه وقتی که آلودگی طبیعی وجود داشت، تنها ۵۰ % توکسین تخریب گردید. احتمالاً آفلاتوکسین ها در ورقه هایی که به طور طبیعی آلوده بودند، بیشتر با پروتئین ها باند می شوند که این امر آنها را کمتر تحت تأثیر تخریب با نور خورشید می سازد.

جدول ۱-۳-۵ : تخریب آفلاتوکسین در مواد غذایی توسط انرژی خورشیدی

Exposure time	Country	Food	Destruction (%)
6 h	India	Peanut cake ^a	50
6h	India	Casein ^a	83
10h	Nigeria	Maize, millet ^b	30, 16
14 h	India	Peanut flakes ^a	90
14 h	India	Peanut flakes ^b	50
15 min	India	Peanut oil ^b	99
10, 40 min	USA	Olive oil ^a	55, 95

^a Artificially contaminated.

^b Naturally contaminated.

بخش چهارم :

۴-۱ : روش های تشخیص و جداسازی آفاتوکسین ها در مواد غذایی :

امروزه یکی از مباحث مهم و رایج در مورد مایکوتوکسین ها، راه های تشخیص سموم و جداسازی آن ها می باشد. با توجه به خصوصیات ساختمانی آن ها، جداسازی و شناسایی آنها معمولاً مشکل است و روش هایی که برای این کار مطرح شده است، معمولاً وقت گیر و نسبتاً گران می باشند. همچنین روش های به کار برده شده در تمام موارد پاسخگوی نیاز محققان نبوده و برخی از سموم هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته اند. مشکل دیگری که وجود دارد این است که معمولاً اندازه گیری این سموم نیاز به وسایل و تجهیزات پیشرفته ای دارد و در آزمایشگاه های معمولی با توجه به امکانات آن ها شناسایی و جداسازی سموم قارچی امکان پذیر نیست، به طوری که در کشور ما امروزه به طور روتین و عمومی اغلب سم آفاتوکسین جداسازی می شود. امروزه تلاش محققان بر این امر استوار است که با آسان تر کردن روش های جداسازی و شناسایی، راه را برای شناخت دقیق این سموم و مقابله با آن هموار کنند. در این بخش به طور اختصار به برخی از روش های مهم و تأیید شده برای جداسازی آفاتوکسین ها و دیگر سموم قارچی از مواد غذایی خواهیم پرداخت.

روش های اندازه گیری آفاتوکسین ها شامل روش های اندازه گیری فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک است. اندازه گیری فیزیکی و شیمیایی بر اساس تفاوت هایی در ویژگی فیزیکی و شیمیایی آفاتوکسین های مختلف بنا نهاده شده است.

۱-۴-۱ : روش های فیزیکی و شیمیایی :

برای آشکار شدن مایکوتوکسین ها، روش های شیمیایی و فیزیکی معمولاً از یک روش استاندارد تبعیت می کنند و شامل مراحل ذیل است :

۱- نمونه برداری،

۲- استخراج،

۳- جمع آوری (رسوب)،

۴- جداسازی (خالص سازی)،

۵- آشکارسازی (تفکیک کردن) و اندازه گیری (توتونچیان، ۱۳۸۱، Quine et al., 1994، Nicholas W et al., 2009).

۱-۱-۴-۱ : نمونه برداری :

مایکوتوکسین ها به ندرت به طور یکنواخت در محصولات طبیعی توزیع می شوند، مثل دانه های غلات. آفاتوکسین ها عموماً در غلظت های بالا در جاهایی که قارچ های سمی به محصولات حمله می کنند، یافت می شوند. بنابراین وقتی به مزارعی که مشکوک به شیوع آفاتوکسین هستند، برخورد می کنیم، نمونه گیری باید از تمام سطح منطقه صورت گیرد. نکته دیگری که باید در نمونه گیری از موارد مشکوک به آفاتوکسین اهمیت دارد، این است که غلظت آفاتوکسین های مواد مختلف در بسیاری از مواقع خیلی کم و در حد نانوگرم در کیلوگرم است.

مقدار مناسب نمونه برای آزمایش به مواد، جنس و همچنین به صحت و درستی نتایجی که می خواهیم به دست آوریم، بستگی دارد. اندازه نمونه نسبت معکوس با دقت اندازه گیری آفاتوکسین ها دارد. بنابراین وقتی سنجش دقیق مدنظر است، نمونه های بیشتری را باید فراهم کنیم.

بعد از جمع آوری نمونه، آن را مخلوط کرده و به هم می زنیم تا آفاتوکسین ها توزیعی هموزنیزه و یکنواختی به دست آوریم. نمونه را از صافی استاندارد شماره ۲۰ عبور می دهیم. در مورد نمونه های

دانه های روغنی برای به دست آوردن توزیع یکنواخت روش های خاصی لازم است. (توتونچیان، ۱۳۸۱، Nicholas W *et al.*, 2009)

۱-۴-۲: استخراج :

برای استخراج سریع می توانیم از حلال های قطبی و غیر قطبی استفاده کنیم. از جمله این حلال ها می توان به موارد ذیل اشاره کرد :

- ۱- متانول،
- ۲- متانول- کلروفرم،
- ۳- متانول- آب،
- ۴- کلروفرم- آب،
- ۵- استون- آب
- ۶- استون- هگزان- آب (توتونچیان، ۱۳۸۱).

۱-۴-۳: خالص سازی :

یکی از روش های اصلی خالص سازی آفلاتوکسین ها به وسیله کروماتوگرافی انجام می گیرد. انواع روش های کروماتوگرافی که برای جداسازی و تشخیص آفلاتوکسین ها کاربرد دارند به قرار ذیل است :

- ۱-۴-۳-۱: روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography = T.L.C.) :
 - روش T.L.C. به علت سرعت عمل، حساسیت و سادگی کار، در اکثر آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش انتخاب نوع ماده جاذب از اهمیت خاصی برخوردار است و معمولاً سلیکاژل همراه با گچ در لایه های نازک به ضخامت ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی متر مورد استفاده قرار می گیرد. حلال های رایج مورد استفاده جهت جداسازی آفلاتوکسین های مورد آزمایش عبارتند از :
 - ۱- کلروفرم- متانول (به نسبت حجمی ۷ : ۹۱ تا ۹۳)
 - ۲- کلروفرم- استن (به نسبت حجمی ۱۵ : ۸۵ تا ۱۰ : ۹۰)
 - ۳- کلروفرم- استن- اتانول (به نسبت حجمی ۱۰ : ۱ : ۸۹)
 - ۴- متانول- آب- اتر (به نسبت حجمی ۲۵ : ۱۵۰ : ۸۲۵)
 - ۵- بنزن- اتانول- آب (به نسبت حجمی ۹۶ : ۱ : ۳).
- در این بین حلال کلروفرم- استن عمومیت بیشتری دارد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

- ۱-۴-۳-۲: روش گاز کروماتوگرافی- اسپکتروفتومتری جرم (G.C.M.) :
- شناسایی آفلاتوکسین به روش گاز کروماتوگرافی- اسپکتروفتومتری جرم (Gas Chromatography Mass)، یک روش سریع برای جداسازی آفلاتوکسین های B_1 و B_2 می باشد که در این روش تشخیص به کمک بمباران الکترونی و شناسایی یون انتخابی صورت می گیرد. در این روش ابتدا عصاره را خالص نموده و سپس به داخل ستون مخصوص تزریق می شود. حد تشخیص این روش برای آفلاتوکسین B_1 و B_2 ، ۰/۱ ppb می باشد (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶).

- ۱-۴-۳-۳: روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (H.P.L.C.) :
- در سال های اخیر، این تکنیک دقیق و حساس برای تجزیه آفلاتوکسین ها به وجود آمده است. این روش توانایی جداسازی آفلاتوکسین های B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 را دارا می باشد. H.P.L.C. معمولاً ذرات کوچک (۰/۱ میکرومتر) را در ستون خلل فرج دار سلیکاژل در مدت ۷ الی ۱۳ دقیقه با آب اشباع شده کلروفرم- سیکلو هگزان- حلال استون (۱ : ۷۵ : ۲۵) می تواند جابجا کند. رابطه میان

بالا ترین ارتفاع و میزان ماده موجود، دامنه خطی است که از ۵ تا ۴۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین را شامل می شود. این روش برای اندازه گیری ۱ تا ۲ نانوگرم آفلاتوکسین های B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 حساس است. روش H.P.L.C. دقیق تر از سایر روش های آنالیز دیگر است، زیرا دارای قدرت تجزیه بالایی است و دارای سرعت، صحت و دقت بیشتری می باشد. با وجود این، چنانچه با روش T.L.C. مقایسه شود، روش مناسبی برای جداسازی آفلاتوکسین در تعداد نمونه های زیاد در مدت زمان کم نیست. مواد مداخله کننده در عصاره آفلاتوکسین مانع از اندازه گیری آفلاتوکسین در H.P.L.C. می شود (توتونچیان، ۱۳۸۱، Nicholas W et al., 2009).

۴-۱-۴-۱ : اندازه گیری :

بعد از جداسازی و آشکار سازی توسط کروماتوگرافی، مقادیر آفلاتوکسین را اندازه گیری می کنند. چندین روش برای اندازه گیری وجود دارد که در این جا بیان می شود.

۱-۴-۱-۴-۱ : اندازه گیری چشمی :

روش تازه اندازه گیری آفلاتوکسین بر اساس رقیق کردن عصاره و اندازه گیری چشمی فلئورسانس در صفحات T.L.C. است. دقت این روش به مهارت شخصی که با آن کار می کند، بستگی دارد و دارای خطای اندازه گیری ۲۰ الی ۲۸ درصد است. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۲-۴-۱-۴-۱ : اندازه گیری فلئوردانس تومتريک :

این روش اندازه گیری، حساس و ظریف است. با استفاده از این روش، مقادیر کمتر از ۱۰۵ در ۸ میکروگرم از AFB_1 خالص را می توان در صفحات T.L.C. با یک دامنه خطی ۱۰۵ در ۱/۵ - ۰/۲۵ اندازه گیری کرد. این روش دقت ۵ درصد را برای آفلاتوکسین خالص دارا می باشد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۳-۴-۱-۴-۱ : اندازه گیری اسپکتروفتومتريک :

به علت این که در اندازه گیری چشمی اختلاف و خطای زیادی دیده می شود، از این روش زیاد استفاده می شود. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۴-۴-۱-۴-۱ : اندازه گیری فلئومتريک :

این روش بر اساس عملکرد اسید در محلول مایع آفلاتوکسین است که نتیجه آن انتقالات شیمیایی است. یکی از موارد اصلی استفاده از این روش، اندازه گیری مقادیر کم AFB_2 در حضور مقادیر زیادی AFB_1 می باشد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۲-۴-۱ : روش های زیستی و بیولوژیکی :

علاوه بر تست های شیمیایی و فیزیکی وقتی به حضور آفلاتوکسین در غذا مشکوک شویم، می توانیم آفلاتوکسین را با استفاده از روش های بیولوژیکی نیز اندازه گیری کنیم. تعدادی از این روش ها توسط دانشمندان پیشنهاد شده است. روش های بیولوژیکی شامل : جنین مرغ و بوقلمون، ماهی قزل آلا و ماهی آزاد، میکروارگانیسم ها، کشت سلولی، گیاهان و موش رت می باشد. اساس روش های اندازه گیری بیولوژیکی بر وجود سم یا اثرات سرطان زایی آفلاتوکسین ها، در موجودات زنده استوار است. در روش های اندازه گیری بیولوژیکی، عموماً از سنجش توسط جنین بوقلمون استفاده می کنند. ماهی قزل آلا و میکروارگانیسم ها در سطح اندازه گیری نیمه کمی برای آفلاتوکسین ها بسیار مناسب است.

۱-۲-۴-۱ : جنین مرغ :

بر اساس مشاهدات انجام گرفته، مقادیر بسیار کم آفاتوکسین در بادام زمینی خام حتی در حدود ۰/۳ میکروگرم باعث مرگ جنین مرغ در ۵ روزگی می شود. مطالعات وسیع LD₅₀ را برای AFB₁ که از روغن بادام زمینی جدا شده، در حدود ۰/۰۲۵ میکروگرم تا ۰/۰۴۵ میکروگرم برای هر تخم مرغ مشخص می کند. از مزایای اندازه گیری با جنین مرغ می توان به سادگی، قابلیت تکثیر و حساسیت این روش اشاره کرد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۱-۲-۴-۲ : بوقلمون :

اندازه گیری آفاتوکسین در بوقلمون بر مبنای درجه هایپرپلازی اپی تلیوم مجاری صفراوی می باشد. (اگر آلودگی به مقادیر بالاتر از ۱۶ میکروگرم برسد.) سم در یک روزگی بوقلمون بیشتر از ۵ مرتبه تزریق می شود و در هفت روزگی باعث مرگ پرنده می شود. برای پی بردن به تکثیر و ازدیاد صفرا، پرنده را می کشند و آن گاه پرنده را مورد آزمایش قرار می دهند. اثر کشندگی سم معمولاً ۷۲ ساعت بعد از تزریق آشکار می شود. LD₅₀ برای جوجه بوقلمون های یک روزه که در آفاتوکسین های مختلفی بررسی شده است، از این قرار است :

$$AFG_1 = 0.87 - 1.18 \text{ (mg/kg)}$$

$$AFB_1 = 0.3 - 1.0 \text{ (ng/kg)}$$

$$AFG_2 = 2.45 - 2.83 \text{ (mg/kg)}$$

$$AFB_2 = 1.7 - 1.76 \text{ (mg/kg)}$$

$$AFM_2 = 1.24 \text{ (mg/kg)}$$

$$AFM_1 = 0.33 \text{ (mg/kg)}$$

از معایب اندازه گیری آفاتوکسین در بوقلمون، پرهزینه بودن آن است و همچنین زمان زیادی را مصرف طلب می کند و احتیاج به تکنسین های تعلیم داده شده می باشد. به علت اینکه هایپرپلازی و رشد مجاری صفراوی واکنش در صدمات آفاتوکسین ها و مواد شیمیایی، باعث تکثیر و ازدیاد مجاری صفراوی می شود، از این خاصیت زیاد نمی توان استفاده کرد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۱-۲-۴-۳ : ماهی قزل آلا - ماهی آزاد :

ماهی قزل آلا به سرطان کبدی حساس است. احتمالاً با فساد لیپوئیدهای کبدی که توسط آفاتوکسین ها ایجاد می شود و به سرطان کبد مبتلا می شود. بنابراین می توان اشاره داشت که ماهی قزل آلا قابلیت استفاده در آزمایشات ایجاد سرطان های شیمیایی را دارد. میزان LD₅₀ برای مخلوط آفاتوکسین های B₁ و G₁ برای ماهی قزل آلا در حدود ۰/۵ - ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم، برآورده شده است. ماهی قزل آلا برای انجام آزمایشات نیمه کمی مناسب است. (مرتضوی و طباطبایی، ۱۳۷۶)

۱-۲-۴-۴ : میکروارگانیزم ها :

اثرات ژنتیکی و غیر ژنتیکی آفاتوکسین ها در میکروارگانیزم مشاهده شده است. یک سری از آفاتوکسین ها وجود دارند که باعث استقرار باکتریوفاژها در باکتری های لیزوژنیک می شوند و ساختار گالاکتوکیناز در متابولیت های AFB₁ در عرض یک ساعت بعد از انجام تست های باکتریایی شروع می شود. بنابراین این سیستم یک اندازه گیری دقیق برای آفاتوکسین ها می باشد. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

۱-۴-۳ : سایر روش های جداسازی :

تعدادی از روش های ایمونواسای (Immunoassay) مانند RIA (Radio immunoassay) نیز برای آفاتوکسین ها و سایر مایکوتوکسین ها به کار برده می شود. از استفاده از روش های

ایمونولوژیک از روش های نسبتاً جدید است که امروزه برای شناسایی و جداسازی میکوتوکسین ها مورد استفاده قرار می گیرد. با استفاده از تکنولوژی تولید آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی بر علیه سم و انواع روش های سریع تشخیص مانند :

- 1- Direct ELISA (الایزای مستقیم)
- 2- Sandwich ELISA (ساندویچ الایزا)
- 3- Flow through membrane based immunoassay ،
- 4- Immuno chromatographic assay،
- 5- Fluorometric assay with immunoaffinity clean-up column or with a solid phase extraction clean-up column
- 6- Fluorescence polarization method

جزو سریع ترین و دقیق ترین روش ها هستند . (توتونچیان، ۱۳۸۱ ، طراوتی و صادق خلیلی ، ۱۳۸۰ ، Michael Z. et al., 2006)

۱-۳-۴-۱ : روش مستقیم الایزا و الیزا ساندویچ :

روش الایزا (Enzyme linked immuno-sorbent assay) روشی است که در آن یک آنزیم به آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر متصل می شود. در یک آزمایش تیپیک ELISA یک فاز جامد پلی استیرن (Polystyrene) با یک پادگن پوشش داده می شود و پس از مجاورت با آنتی سرم گرمخانه گذاری می گردد. پادتن اختصاصی حاوی یک برچسب آنزیمی به آن اضافه می شود. پس از یک شستشوی ملایم آنزیم باقیمانده در لوله یا حفره (چاهک) میکروتایتتر (Microtiter well) جهت تشخیص میزان پادتن های اختصاصی در سرم اولیه مورد آزمایش قرار می گیرد. آنزیمی که در این تکنیک به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرد، آنزیم هورس رادیش پراکسیداز (Horseradish peroxidase) می باشد و حضور آن را با اضافه کردن سوبسترای خاص پراکسیداز اندازه گیری می کنند. مقدار آنزیم موجود با استفاده از کالری- متری (Colorimeter) و با اندازه گیری سوبسترای آنزیم توسط دستگاه ELISA reader تعیین می گردد. (رضویلر ، ۱۳۸۱)

نوعی از این تکنیک به نام ساندویچ الایزا موسوم است که در آن پادگن مورد استفاده حداقل باید دو موضع اتصال داشته باشد. در این سیستم ابتدا پادتن جذب فاز سخت می شود و سپس شسته می شود. محلول مورد آزمایش حاوی پادگن مورد نظر به آن اضافه می گردد و پس از شستشو پادتن برچسب دار به آن اضافه می شود که بخشی از آن به پادگن متصل شده و بقیه از طریق شستشو خارج می گردد و در پایان سوبسترای آنزیم اضافه می شود. میزان پادگن برابر با میزان محصول به دست آمده از سوبسترای آنزیم خواهد بود. (رضویلر ، ۱۳۸۱)

به طور کل این روش ها که در تحقیق حاضر هم به منظور جداسازی و اندازه گیری مقدار کمی توتال آفلاتوکسین (G_1 ، G_2 ، B_1 ، B_2) از خوراک ماهیان سردابی، از آن استفاده شده است، متدهایی با کیت پورتابل و سریع و ساده هستند و بسیار اختصاصی عمل می کنند. ولی عیب این کیت ها این است که فقط برای یک بار قابل استفاده هستند و این خود هزینه های غربالگری های حجیم را افزایش می دهد. از طرفی داشتن رنج تشخیصی محدود که مرتبط با آنتی بادی های محدود و انگشت شمار حساس مونو یا پلی کلونال است. یکی دیگر از مشکلات این روش است که عمومیت آن را جهت بعضی از میکوتوکسین ها تحت تأثیر قرار داده است. (Nicholas W. et al., 2009)

فصل دوم :

روش کار

و

کارهای انجام شده

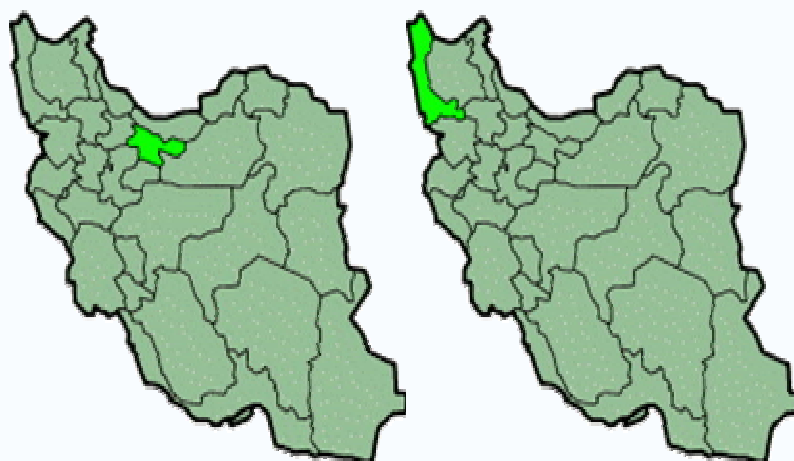
۲-۱: آشنایی با ویژگی های جغرافیایی و وضعیت پرورش ماهی قزل آلا در استان های آذربایجان غربی و تهران :

استان آذربایجان غربی که برای امور کشاورزی و دامپروری منطقه کاملاً مستعدی بوده و البته از این نظر یکی از استان های فوق العاده حاصلخیز و متراکم به حساب می آید، در شمال غربی فلات ایران بین ۵۳/۸۵ تا ۳۹/۴۶ درجه شمالی و ۳/۴۴ تا ۴۷/۲۳ درجه طول شرقی قرار گرفته است و مرکز آن شهر ارومیه است. در کناره غربی این استان، دریاچه ارومیه قرار دارد. از شمال به کشورهای جمهوری آذربایجان و ترکیه، از مغرب به کشورهای ترکیه و عراق، از شرق به استان آذربایجان شرقی و استان زنجان و از جنوب به استان کردستان محدود است. مساحت استان برابر ۳۷,۰۵۹ کیلومتر مربع است که سیزدهمین استان بزرگ کشور محسوب می شود و ۲۵/۲ مساحت کل کشور را تشکیل می دهد. جمعیت استان آذربایجان غربی طبق سرشماری سال ۱۳۸۵ برابر با ۲,۸۷۳,۴۵۹ نفر می باشد که ۴/۰۸ جمعیت کل کشور را در خود جای داده است و از این لحاظ هشتمین استان پرجمعیت کشور محسوب می شود. استان آذربایجان غربی یکی از مناطق کوهستانی کشور است و توپوگرافی متنوع و گسترده ای دارد. بر اساس ساختار طبیعی استان، اکوسیستم های ویژه ای از ترکیب گیاهان در سطوح مختلف پوشش گیاهی در سطوح مختلف توپوگرافی به وجود آمده است که اهم آنها به شکل جنگلها و مراتع خودنمایی می کنند. این استان عمدتاً تحت تأثیر جریان هوای مرطوب اقیانوس اطلس و دریای مدیترانه است، ولی در برخی از ماههای زمستان، توده هوای سردی از اطراف شمال، هوای مدیترانه ای آن را متأثر کرده و موجب کاهش قابل توجه دما می شود. سایت اینترنتی ویکی پدیا (

ارومیه، اشنویه، بوکان، پیرانشهر، تکاب، چالدران، خوی، سردشت، سلماس، شاهین دژ، ماکو، مهاباد، میاندوآب و نقده، شهرستان های اصلی استان آذربایجان غربی هستند. (شکل ۲-۱، ۲-۲ و ۲-۳)

میزان بارندگی این استان ۳۰۰ الی ۴۰۰ میلی متر در سال و حداکثر آن در طول فصول پاییز و زمستان است. حدود ۱۳۰۰ چشمه دائمی و فصلی و ۴۴۰۰۰ حلقه چاه های عمیق، نیمه عمیق و آرتزین، ۱۳ دریاچه پشت سد و ۳۴ رودخانه دائمی و فصلی در این استان موجود است. (سیمای شیلات استان آ.غ.، ۱۳۸۳) بدین سان در این استان به لحاظ شرایط خاص جغرافیایی و اقلیمی، پتانسیل های مستعد بسیاری در زمینه تکثیر و پرورش انواع ماهیان دارد. به گونه ای که در حال حاضر میزان تولید سالانه این استان در خصوص انواع آبزیان پرورشی به ۳۸۶۰ تن در سال رسیده است. در بین ماهیان پرورشی، ماهیان سردابی به ویژه قزل آلا رنگین کمان با نام عمومی Rainbow trout و نام علمی *Onchorhynchus mykiss* وجود دارد که در حال حاضر در سبد غذایی افراد جامعه جایگاه ویژه ای پیدا کرده است. این امر استان را به قطب مهم شیلات کشور تبدیل کرده است. چنانچه فعالیت سردابی بسیار متنوع بوده و شامل استخرهای سردابی منفرد (۲۳ استخر)، استخرهای دو منظوره کشاورزی و استخرهای ذخیره آب کشاورزی (۱۰۳ مزرعه)، پرورش در قفس (۱۰ مورد) و پرورش در استخرهای خاکی (۱۱ استخر) می باشد و احداث مجتمع های سردابی با تولید بسیار بالا در حال اجرا و راه اندازی است. در حال حاضر تولید ماهی قزل آلا در این استان به رقم ۱۷۰۰ تن رسیده است و به دیگر استان های کشور هم صادر می شود. (سیمای شیلات استان آ.غ.، ۱۳۸۳) همین امر زمینه را برای فعالیت در مورد تولید مکانیزه و در تناژ بالای خوراک آبزیان در جای جای کشور فراهم نموده است. به گونه ای که امروزه در نقاط مختلف کشور و از جمله در استان های تهران (به عنوان استان برتر در زمینه تولید خوراک آبزیان) و آذربایجان غربی شرکت های بزرگ و کارخانجات متعدد تولید خوراک آبزیان مشغول به فعالیت بوده و جیره غذایی ماهیان پرورشی را در مراحل مختلف رشد، تولید و به بازار عرضه می کنند.

استان تهران به مرکزیت شهر تهران، با وسعتی حدود ۱۸۸۱۴ کیلومتر مربع بین ۳۴ تا ۳۶/۵ درجه عرض شمالی و ۵۰ تا ۵۳ درجه طول شرقی واقع شده است. این استان از شمال به استان مازندران، از جنوب به استان قم، از جنوب غرب به استان مرکزی، از غرب به قزوین و از شرق به استان سمنان محدود است. جمعیت آن در سال ۲۰۰۷، بالغ بر ۱۳ میلیون و ۳۰۰ هزار نفر تخمین زده شده است. مرکز آن و به علاوه پایتخت ایران، شهر تهران است. کرج، ری، شمیرانات، اسلامشهر، لار، و جاجرود از دیگر مراکز جمعیتی مهم استان هستند. استان تهران دارای ۱۳ شهرستان، ۴۴ شهر و ۷۸ دهستان است. (سایت اینترنتی ویکی پدیا) این استان همچنان که عنوان شد استان برتر کشور در زمینه تولید خوراک آبزیان است و در زمینه ماهیان سردآبی پرورشی نیز نقش به سزایی دارد. (شکل ۱-۲ و ۲-۲)



شکل ۱-۲: موقعیت استان های آذربایجان غربی و تهران در نقشه ایران (سایت اینترنتی ویکی پدیا)



شکل ۲-۲: موقعیت شهرستان های استان های تهران و آذربایجان غربی (سایت اینترنتی ویکی پدیا)

۲-۲ : روش تحقیق :

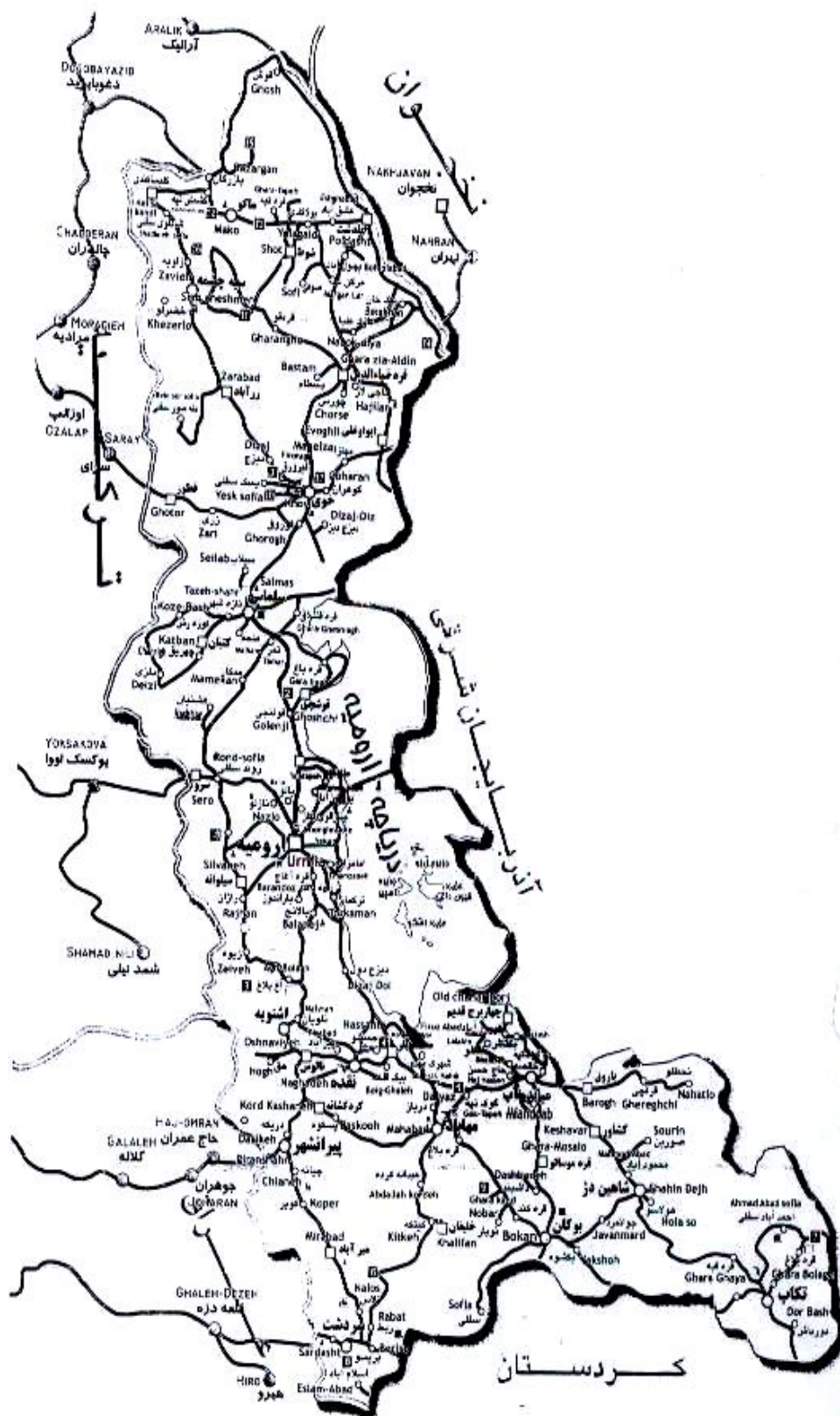
۱-۲-۲ : نوع روش تحقیق:

در این تحقیق، نظر به اینکه به دنبال توصیف صرف واقعیت های موجود و بدون کوچکترین دخل و تصرف هستیم، لذا روش تحقیق توصیفی از نوع اکتشافی (Survey) و از دسته مشاهده ای مقطعی (observational: Cross- Sectional) می باشد، چراکه در مقطع خاصی از زمان به این بررسی پرداخته می شود.

از طرفی با توجه به اینکه در تحقیق عنوان شده، درصدد آن هستیم که با مطالعه متغیرهای تحت بررسی به تولید داده پردازیم و از طریق آنالیزهای آماری یافته ها را به تصویر کشانیم، لذا روش گردآوری اطلاعات در این پروژه به صورت میدانی (در خصوص تولید داده ها) و کتابخانه ای (جهت تهیه چارچوب نظری بحث) خواهد بود.

۲-۲-۲ : جامعه آماری :

جامعه آماری انبار خوراک ماهیان سردابی (قزل آلا ی رنگین کمان) استخرها و مزارع پرورشی و خوراک تولیدی کارخانجات تولید خوراک دام و طیور و آبزیان تهران و آذربایجان غربی در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶ هجری شمسی، بود.



شکل ۲-۳: موقعیت شهرستان ها و شهرهای مختلف استان آذربایجان غربی (از اینترنت گرفته شده است)

۳-۲-۲: واحد نمونه گیری :

الف- دفعه در هر ماه انبار (در مورد استخرهای پرورشی)
ب- دفعه در هر ماه تولید (در مورد کارخانجات تولید خوراک دام، طیور و آبزیان)

۴-۲-۲: روش نمونه گیری :

الف- راندوم قشری (stratified random) در مورد استخرهای پرورشی با توجه به تنوع در نوع استخرها و مزارع پرورشی بود.
ب- راندوم ساده (simple random) در مورد کارخانجات خوراک دام و طیور و آبزیان بود.

۵-۲-۲: حجم نمونه :

تعداد کل سیستم های پرورشی ۱۴۷ مورد (شامل ۱۰۳ مزرعه دو منظوره و ذخیره آب کشاورزی، ۲۳ استخر منفرد، ۱۱ سد خاکی و ۱۰ قفس پرورشی) می باشد و یک کارخانه تولید خوراک آبزیان در استان آذربایجان غربی و کارخانجات تولید خوراک ماهیان در تهران مد نظر است. در نتیجه در مورد مزارع پرورشی با توجه به کمی بودن متغیر مورد مطالعه، حجم نمونه بر اساس

فرمول $n = \frac{N}{1 + Ne^2}$ برآورد شده است (Guerrero De Leon et al., 1992) و جهت تعدیل نمونه

از فرمول $n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0}{N}}$ استفاده گردیده است. (بازرگان، ۱۳۷۷) مراحل مذکور به شرح ذیل می باشد:

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2} = \frac{147}{1 + 147(0.05)^2}$$

$$\Rightarrow n = 107$$

$$\& \frac{n}{N} = \frac{107}{148} = 0.72$$

با توجه به اینکه نسبت حجم نمونه به حجم جامعه از ۰/۵ بیشتر است :

$$\Rightarrow n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0}{N}} = \frac{107}{1 + 0.72}$$

نمونه در طول دوره نمونه برداری از مزارع پرورشی استان آذربایجان ۶۲ (نهایی) n غربی

در ادامه تعداد نمونه ها در طول دوره تحقیق را، بر اساس هر نوع استخر بر اساس فرمول های ذیل محاسبه می کنیم :

$$nh_1 = n\left(\frac{Nh_1}{N}\right) = 62\left(\frac{103}{147}\right) = 44$$

$$nh_2 = n\left(\frac{Nh_2}{N}\right) = 62\left(\frac{23}{147}\right) = 10$$

$$nh_3 = n\left(\frac{Nh_3}{N}\right) = 62\left(\frac{11}{147}\right) = 4$$

$$nh_4 = n\left(\frac{Nh_4}{N}\right) = 62\left(\frac{10}{147}\right) = 4$$

nh_1 = نمونه از انبار خوراک مزرعه های دو منظوره و ذخیره آب کشاورزی
 nh_2 = نمونه از انبار خوراک مزرعه های منفرد

nh_3 = نمونه از انبار خوراک سد های خاکی پرورشی

nh_4 = نمونه از خوراک قفس های پرورشی

نظر به اینکه عامل زمان نیز در مطالعه حاضر مدنظر قرار گرفته است، نمونه نهایی در فاصله زمانی شش ماه اول سال ۱۳۸۶، به تفکیک زیرگروه ها مجدداً بر اساس فرمول $nh = n(\frac{Nh}{N})$ بر آورد گردید که در جدول شماره ۱-۲ نشان داده شده است.

در مورد کارخانجات تولیدی خوراک آبزیان در تهران (شامل کارخانجات چینه تهران (A)، آبی غذا (B)، به پرور (C)، خوراک دام پارس (D) و ثمرگل (E) و آذربایجان غربی (میلاد مهاباد)، هر ماه یک نمونه از تولید کارخانه در طول دوره تحقیق به منظور ارزیابی مقادیر باقیمانده آفاتوکسین توتال و بررسی پتانسیل تولید آفاتوکسین اخذ شد و در مجموع تعداد ۳۶ نمونه اخذ خواهد شد. بدین سان کل نمونه ها برابر با $۹۸ = ۶۲ + ۳۶$ نمونه در طول دوره نمونه برداری بود.

جدول ۱-۲: تعداد نمونه های استحصال شده از انبار خوراک مزارع مختلف پرورشی استان آذربایجان غربی

n (به تفکیک مرکز تولید بر حسب ماه)	n (در کل)	N	
۶	۴۴	۱۰۳	مزرعه دو منظوره و ذخیره آب کشاورزی
۲	۱۰	۲۳	استخر منفرد
۱	۴	۱۱	سد خاکی
۱	۴	۱۰	قفس پرورشی
۱۰	۶۲	۱۴۷	جمع



شکل ۲-۴: نمایی از استخر منفرد (طرف راست) و استخر سدخاکی (طرف چپ) در استان آذربایجان غربی (تصاویر از نگارنده)

لازم به ذکر است که طی مراجعه به مراکز کشت به روش قفس پرورشی (cage culture) در آب های پشت سد ارس، مراکز غیر فعال بودند و لذا نمونه برداری از این مراکز امکان پذیر نشد و نمونه ها به نسبت بین دیگر مزارع تقسیم گردید . از طرفی به منظور نمونه برداری بر اساس برداشت هر نمونه در ۱۵ هر ماه از فصول بهار و تابستان در هر مزرعه، در نهایت سهم مزارع دو منظوره، ۴۲ (۷ مزرعه و ۶ نمونه)، مزارع منفرد ۱۲ نمونه (۲ مزرعه و ۶ نمونه) و مزارع سد خاکی ۶ نمونه (یک مزرعه و ۶ نمونه) تعیین گردید و در کل ۶۰ نمونه در دوفصل بهار و تابستان ۱۳۸۶،

از مزارع پرورش ماهی استان آذربایجان غربی نمونه برداری شد که با احتساب ۶ نمونه از کارخانه تولید خوراک آذربایجان غربی و ۳۰ نمونه از کارخانجات تولید خوراک استان تهران (۵ کارخانه و ۶ نمونه در دو فصل)، در کل ۹۶ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. (شکل های ۲-۴ تا ۲-۷)



شکل ۲-۵: نمایی از کارخانه تولید خوراک آذربایجان غربی (عکس از نگارنده)

۳-۲: روش کار :

به منظور اندازه گیری متغیرهای اصلی مورد مطالعه که در مقدمه رساله به آن اشاره شد، در پژوهش حاضر از مواد و وسایل و روش مشروحه ذیل استفاده شد :

۲-۳-۱: تعیین میزان شیوع آسپرژیلوس فلاووس و آ. پارازیتیکوس در خوراک ماهیان سردابی:
۲-۳-۱-۱: نمونه گیری :

دو نمونه هر کدام به میزان یک کیلوگرم بر اساس قوانین نمونه برداری صحیح که نماینده ای از مجموع خوراک هر انبار در مراکز پرورشی است در پانزدهم هر ماه شمسی ، برداشت شد و در جعبه ها یا کیسه های خشک با حداقل اثرگذاری عوامل محیطی و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه مربوط انتقال داده شد. (در مورد نمونه هایی که جهت اندازه گیری آفلاتوکسین به روش الیزا استفاده می شد، نمونه ها در شرایط فریز نگهداری شدند)



شکل ۲-۶: نماهایی از چند استخر دو منظوره و ذخیره آب کشاورزی استان آذربایجان غربی



شکل ۲-۷: نماهائی از انبارهای نگهداری خوراک چند استخر پرورشی ماهیان سردآبی استان آ. غ. (تصاویر از نگارنده)

۲-۳-۱-۲ : آماده سازی و کشت و شمارش :

الف- وسایل مورد نیاز :

پلیت یکبار مصرف، بن ماری ، آسیاب، لوله آزمایش معمولی، بشر و ارلن های ۱۰۰ و ۲۵۰ سی سی، بطری های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری درپوش دار، اتوکلاو، هود مجهز به لامپ U.V. ، فور یا آون، ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱، اپلیکاتور، شعله گاز، پیپت ۰/۱ تا ۱۰ میلی لیتری، سمپلر ۱۰ تا ۱۰۰۰ لاندا و سر سمپلر، اینکوباتور یا گرمخانه، میکروسکوپ نوری ، لام و لامل معمولی، آنس حلقوی و نوک تیز، انواع دترجنت ها جهت شستشو و ضدعفونی.

ب- مواد مورد نیاز:

محیط های کشت سابورو دکستروز آگار و مالت اکستراکت آگار، سرم فیزیولوژی، رنگ لاکتوفنل کاتن بلو.

پس از انتقال و آماده سازی در آزمایشگاه، کشت و تشخیص بر اساس استاندارد شماره ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران (روش جستجو و شمارش قارچها (کپکها و مخمرها) و شمارش پرگنه در 25 درجه سلسیوس) و با استفاده از محیط های عمومی کشت قارچ سابورو دکستروز آگار (S.D.A. = Sabouraud- dextrose agar (Merck)) و مالت اکستراکت آگار (M.E.A = Malt extract agar (Merck)) انجام گرفت.

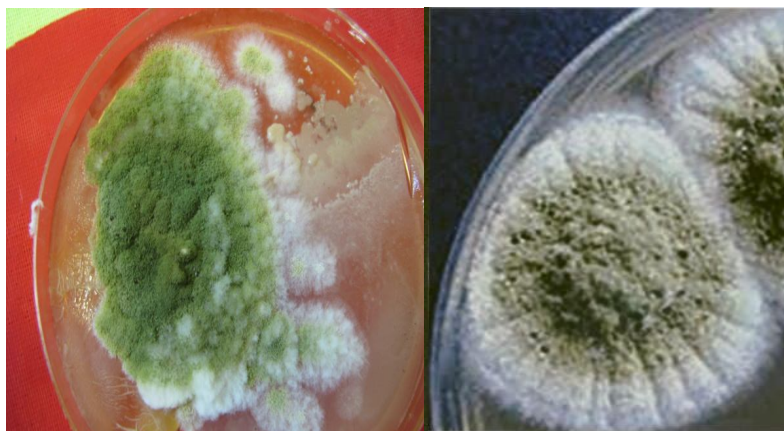
بعد از تهیه محیط های کشت مطابق دستورالعمل مربوط آنها را در ۴۵ درجه سلسیوس بن ماری به صورت مذاب نگه می داریم تا پس از تهیه رقت از نمونه، در کشت پور پلیت (Pour-plate) Culture از آن ها بهره بریم (استاندارد شماره ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران).

نمونه ها در شرایط استریل به خوبی توسط خردکن، آسیاب نموده و توسط سرم فیزیولوژی استریل از تمامی نمونه ها، رقت ۱ به ۱۰ تهیه گردید. برای این کار، از نمونه های خرد شده، ۵ گرم توسط ترازوی دیجیتالی وزن شده و در ۵۰ میلی لیتر سرم مذکور، در کنار شعله و زیر هود، مخلوط شده و توسط اپلیکاتور استریل به خوبی هم زده شدند. سپس مدتی صبر کرده تا نمونه ها به خوبی ته نشین شوند. در ادامه به طور جداگانه به هر یک از پلیت های استریل، یک میلی لیتر از قسمت بالای نمونه های رقیق شده را، اضافه نمودیم. سپس ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت های مورد نظر ذوب شده را که دمای آن در حدود ۴۵ درجه سلسیوس می باشد را به هر یک از پلیت ها اضافه و به آرامی آنها را مخلوط نمودیم. فاصله زمانی بین تهیه رقت و اضافه نمودن محیط کشت به پلیت ها از ۱۵ دقیقه تجاوز ننمود (استاندارد شماره ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران).

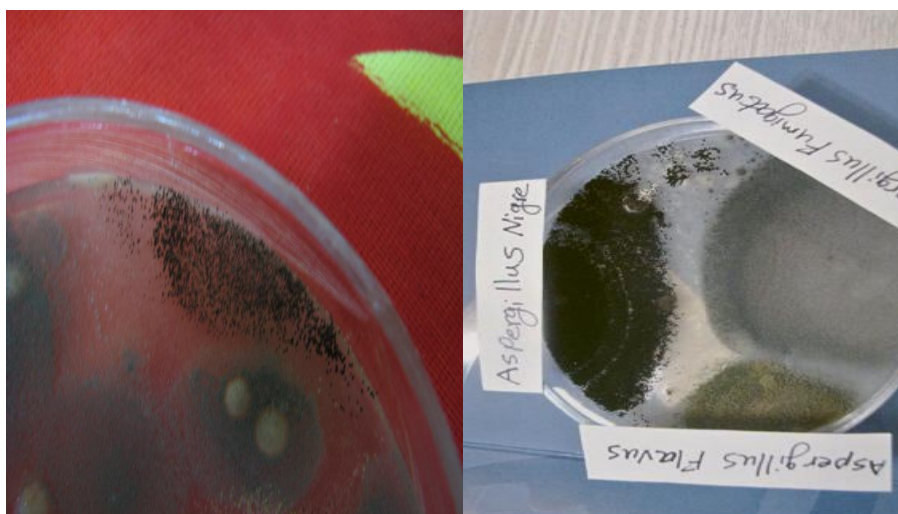
پس از مخلوط شدن نمونه مورد آزمون و محیط کشت، تا جامد شدن محیط، پلیت ها را بر روی سطح صاف و خنک قرار داده، سپس محیط S.D.A را در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس و محیط M.E.A. را در حرارت ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ الی ۵ روز نگهداری نمودیم. با توجه به اهمیت رطوبت در کشت قارچ ها برای جلوگیری از خشک شدن محیط ها، دهانه ظروف کشت را با نوار چسب چسباندیم. اما از آنجا که قارچ ها به شدت هوازی هستند، برای فراهم نمودن اکسیژن روزانه نوار چسب را باز نموده و مجدداً می چسباندیم. همچنان که قبلاً هم عنوان شد، گونه های *آسپرژیلوس*، کپک هایی با رشد سریع هستند و پرگنه های موجود به طور معمول طی ۲ تا ۳ روز ظاهر شدند. (شکل ۲-۸ و ۲-۹)

افتراق *آ فلاووس* و *آ. پارازایتیکوس* از تقریباً تمامی گونه های دیگر دشوار نیست. هر دوی آنها به سرعت بر روی محیط های کشت شناسایی استاندارد نظیر چاپکس آگار (Czapeks Agar) یا عصاره مالت آگار (M.E.A.) یا عصاره مخمر چاپکس (C.Y.A.) رشد کرده و کونیدی های سبز مایل به زرد (مغز پسته ای) بر روی کلنی ها ایجاد می کنند که در غیر این صورت بی رنگند. تشخیص *آ فلاووس* از *آ. پارازایتیکوس* دشوارتر است. ضمن آنکه عدم توافقی در میان مطالعه کنندگان این گونه ها وجود دارد. آخرین بررسی ها به این نکته اشاره دارد که بافت دیواره های کونیدی ها قابل اتکاترین خصیصه افتراقی است. دیواره های کونیدی های *آ فلاووس* معمولاً صافند یا ناهمواری و زبری خفیفی دارند، در حالی که دیواره های *آ پارازایتیکوس* مشخصاً هنگامی که با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر عدسی شیئی نگریسته می شوند، زبر و ناهموارند.

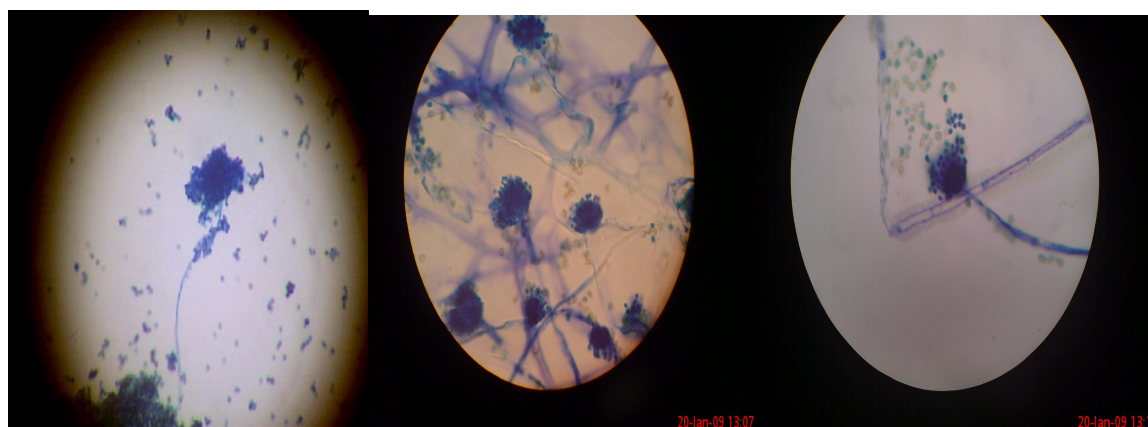
بر اساس استاندارد شماره ۹۹۷ مؤسسه استاندارد ایران، به منظور مطالعه میکروسکوپی پرگنه های ایجاد شده و تشخیص جنس و گونه قارچ، از روش خرد کردن پرگنه ها (Teased mount) و رنگ آمیزی توسط لاکتوفنل کاتن بلو بهره بردیم. چنانچه توسط سوزن سرکج پلاتینی قسمت کوچکی از پرگنه قارچ را برداشته و بر روی لام حاوی یک قطره محلول لاکتوفنل کاتن بلو قرار داده و با لامل سطح آن را پوشانیدیم. سپس رنگ اضافی را خارج نموده و در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰، قارچ ها را مورد بررسی قرار دادیم. (شکل ۲-۱۰)



شکل ۲-۸: تصاویر پرگنه های *آسپرژیلوس فلاووس* تشکیل شده بر محیط های کشت SDA (طرف راست) و MEA (طرف چپ) (تصاویر از نگارنده)



شکل ۲-۹: تصاویر پرگنه های گونه های مختلف *آسپرژیلوس* تشکیل شده بر محیط های کشت SDA (طرف راست) و *آسپرژیلوس نیجر* (طرف چپ) (تصاویر از نگارنده)



شکل ۲-۱۰: تصاویر میکروسکوپی (۴۰*) رنگ آمیزی شده *آسپرژیلوس فلاووس* (تصاویر از نگارنده)

۲-۳-۲: اندازه گیری باقیمانده آفلاتوکسین توتال در خوراک ماهیان سردآبی:
۲-۳-۲-۱: نمونه گیری:

به روش عنوان شده در بخش ۲-۳-۱-۱ از مراکز پرورشی و کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان انجام شد. نظر به عدم امکان انجام آزمایش به صورت تکی و موردی (با توجه به نوع روش آزمایش

و کیت های مصرفی که در ادامه به آن اشاره خواهد شد، که امکان آزمایش مورد به مورد را سلب می کند)، نمونه ها در یخچال نگهداری شدند تا تغییری در میزان آفلاتوکسین های احتمالی موجود به وجود نیاید. (با توجه به این که تولید این سموم در شرایط درجه حرارت ۲۵ تا ۳۲ درجه سلسیوس و رطوبت بین ۱۲ تا ۲۸ % دیده می شود) (Gary, 1996, Quine et al. , 1994).

۲-۳-۲ : آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری آفلاتوکسین توتال نمونه ها به روش الیزا : الف- وسایل مورد نیاز:

دستگاه آسیاب، الک نمرة ۲۰، بطری های درپوش دار استریل با حجم های مختلف ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری، استوانه مدرج، کاغذ صافی وات من نمرة ۱، میکروپیپت، دستگاه الیزا ریدر مدل 2000- USA Stat Fax.

ب- مواد مورد نیاز :

نمونه غذای پلت شده ماهی، متانول ۷۰ %، کیت Agra Quant® Total Aflatoxin، آب دیونیزه. بر اساس دستورالعمل و بروشور کیت مربوط که در ادامه به آن اشاره خواهد شد، به روش ذیل اقدام شد :

۱- مقدار مناسبی از نمونه را آسیاب و آن را از الک نمرة ۲۰ عبور دادیم.
۲- ۲۰ گرم از نمونه الک شده وزن کرده و به یک ظرف استریل انتقال دادیم.
۳- به ظرف فوق ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۷۰ درصد متانول (۷۰/۳۰ حجمی با آب) را افزوده و درب آن را محکم بستیم.
۴- به مدت ۳ دقیقه آن را محکم به هم زدیم.

۵- اجازه دادیم نمونه ها ته نشین شوند. سپس محلول رویی را با کاغذ صافی نمرة ۱ واتمن صاف نمودیم و مایع را به یک ظرف تمییز انتقال دادیم.

پس از آماده سازی اولیه، نمونه آماده را جهت اندازه گیری مقدار آفلاتوکسین توتال بر اساس روش سنجش ELISA مستقیم، که به علت سرعت در تشخیص، دقت فوق العاده و حساسیت زیاد به عنوان یک تست غربالگر خوب در این زمینه مطرح است، به کار بردیم. در این راستا از کیت ویژه آفلاتوکسین توتال Agra Quant® Total Aflatoxin Assay 4/40 (در محدوده 4 – 40 ppb) از شرکت اتریشی Romer labs® که توسط شرکت ایرانی «فرآیند دانش آراین» خریداری و وارد گردید، استفاده شد. محتویات اصلی کیت که در انجام آزمایش به همراه دیگر مواد و وسایل اشاره شده مورد استفاده قرار گرفت به شرح ذیل است:

۱- میکروول یا چاهک های ۹۶ تایی (۱۲ ردیف چاهک ۸ تایی) پوشانده شده با آنتی بادی که درون یک بسته نازک نایلونی مهر و موم شده بود.

۲- چاهک های ۹۶ تایی (۱۲ ردیف چاهک ۸ تایی) غیرپوشانده شده با آنتی بادی که در پایه به رنگ آبی/سبز علامت گذاری شده بودند.

۳- ۵ عدد ویال ۱/۵ میلی لیتری از هر استاندارد آفلاتوکسین مشتمل بر ۰، ۴، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ppb.

۴- یک بطری کوچک ۲۵ میلی لیتری از آفلاتوکسین کونژوگه شده (با درپوش سبز)،

۵- یک بطری کوچک ۱۵ میلی لیتری از محلول سوبسترا (با درپوش آبی)،

۶- یک بطری کوچک ۱۵ میلی لیتری از محلول متوقف کننده (با درپوش قرمز) (شکل ۲-۱۱)

نحوه کار به طور خلاصه به شرح ذیل است :

الف- قبل از شروع به کار، کیت و نمونه ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دادیم.

ب- ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه را به چاهک های سبز رنگ پلیت میکروتیتر جهت رقیق سازی و کونژوگه شدن نمونه ها و استاندارد، ریختیم.

ج- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه یا استاندارد را به کونژوگه اضافه نموده و محتویات را خوب مخلوط نمودیم.



شکل ۲-۱۱: تصویر کیت آگراکوانت آفلاتوکسین و محتویات آن (تصاویر از نگارنده)

د- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک فوق را به چاهک پوشانده شده با آنتی بادی انتقال داده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمودیم.

ه- محتویات چاهک ها را دور ریخته و چاهک با آب دیونیزه ۵ مرتبه شستشو دادیم.

و- به کمک دستمال کاغذی تمییز آب چاهک ها را گرفتیم.

ز- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوپسترا به چاهک افزوده و ۵ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری نمودیم.

ح- سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به چاهک ها افزوده و یک تا دو دقیقه بعد ABS چاهک ها را توسط دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) با فیلتر ۴۵۰ نانومتر قرائت نمودیم. (لازم به ذکر است نوع دستگاه الایزا ریدر STAT FAX 2000 ساخت کشور آمریکا بود) (شکل ۲-۱۲). غلظت AFT نسبت معکوس با میزان رنگ در میکرو پلیت ها دارد.



شکل ۲-۱۲: دستگاه ELISA Reader مدل STAT FAX 2000 (تصویر از نگارنده)

در فصل دیگر به نتایج به دست آمده از آزمایشات انجام شده و تجزیه و تحلیل داده ها خواهیم پرداخت.

فصل سوم : نتایج آزمایشات و تجزیه و تحلیل داده ها

۱-۳ : نتایج :

۱-۱-۳ : نتایج مربوط به بررسی میزان شیوع سویه های آفلاتوکسین زای اسپرژیلوس در نمونه های خوراک ماهیان سردآبی :

پس از انجام آزمایشات عنوان شده در خصوص جداسازی و شناسایی قارچ ها از ۹۶ نمونه اخذ شده از کارخانجات و انبار مزارع پرورشی در دو استان آذربایجان غربی و تهران، نتایجی به شرح جدول ذیل (جدول شماره ۱-۱-۳) به دست آمد :

جدول ۱-۱-۳ : نتایج آزمایشات مربوط به بررسی حضور عوامل قارچی موجود در نمونه های خوراک ماهی قزل آلا در دو استان آذربایجان غربی و تهران در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶ (در دو محیط کشت M.E.A و S.D.A)

نوع محیط کشت شماره نمونه	محیط کشت S.D.A.	محیط کشت M.E.A.	نوع محیط کشت شماره نمونه	محیط کشت S.D.A.	محیط کشت M.E.A.
۱ (فروردین / آءد A)	-	-	۴۹ (فروردین / آءم B)	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
۲ (اردیبهشت / آءد A)	-	-	۵۰ (اردیبهشت / آءم B)	-	-
۳ (خرداد / آءد A)	-	-	۵۱ (خرداد / آءم B)	-	-
۴ (تیر / آءد A)	-	-	۵۲ (تیر / آءم B)	-	-
۵ (مرداد / آءد A)	-	-	۵۳ (مرداد / آءم B)	-	-
۶ (شهریور / آءد A)	-	-	۵۴ (شهریور / آءم B)	-	-
۷ (فروردین / آءد B)	-	-	۵۵ (فروردین / آءم B)	-	-
۸ (اردیبهشت / آءد B)	-	-	۵۶ (اردیبهشت / آءم B)	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus</i>
۹ (خرداد / آءد B)	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	۵۷ (خرداد / آءم B)	<i>Rhizopus</i>	-
۱۰ (تیر / آءد B)	-	-	۵۸ (تیر / آءم B)	-	-
۱۱ (مرداد / آءد B)	-	-	۵۹ (مرداد / آءم B)	-	-
۱۲ (شهریور / آءد B)	-	-	۶۰ (شهریور / آءم B)	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
۱۳ (فروردین / آءد C)	-	-	۶۱ (فروردین / ک.خ. آءد C)	-	-
۱۴ (اردیبهشت / آءد C)	-	-	۶۲ (اردیبهشت / ک.خ. آءد C)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
۱۵ (خرداد / آءد C)	-	-	۶۳ (خرداد / ک.خ. آءد C)	-	-

<i>Aspergillus flavus</i>	-	۶۴ (تیر/ک.خ.آ)	-	-	۱۶ (تیر/ا.د C)
-	-	۶۵ (مرداد/ک.خ.آ)	-	-	۱۷ (مرداد/ا.د C)
-	-	۶۶ (شهریور/ک.خ.آ)	-	-	۱۸ (شهریور/ا.د C)
-	-	۶۷ (فروردین/ک.ب.ت° (A)	-	-	۱۹ (فروردین/ا.د D)
-	-	۶۸ (اردیبهشت/ ک.ب.ت A)	-	-	۲۰ (اردیبهشت/ا.د D (
-	-	۶۹ (خرداد/ک.ب.ت A)	-	-	۲۱ (خرداد/ا.د D)
-	-	۷۰ (تیر/ک.ب.ت A)	-	-	۲۲ (تیر/ا.د D)
-	-	۷۱ (مرداد/ک.ب.ت A)	-	-	۲۳ (مرداد/ا.د D)
-	-	۷۲ (شهریور/ک.ب.ت A)	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	۲۴ (شهریور/ا.د D)
-	-	۷۳ (فروردین/ک.ب.ت B)	-	-	۲۵ (فروردین/ا.د E)
-	-	۷۴ (اردیبهشت/ک.ب.ت B)	-	-	۲۶ (اردیبهشت/ا.د E (
-	-	۷۵ (خرداد/ک.ب.ت B)	-	-	۲۷ (خرداد/ا.د E)
-	-	۷۶ (تیر/ک.ب.ت B)	<i>Aspergillus fumigatus & A. niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus & A. niger</i>	۲۸ (تیر/ا.د E)
<i>Aspergillus flavus</i>	-	۷۷ (مرداد/ک.ب.ت B)	-	-	۲۹ (مرداد/ا.د E)
-	-	۷۸ (شهریور/ک.ب.ت B)	-	-	۳۰ (شهریور/ا.د E)
-	-	۷۹ (فروردین/ک.ب.ت C)	-	-	۳۱ (فروردین/ا.د F)
-	-	۸۰ (اردیبهشت/ک.ب.ت C)	-	-	۳۲ (اردیبهشت/ا.د F (
-	-	۸۱ (خرداد/ک.ب.ت C)	-	-	۳۳ (خرداد/ا.د F)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	۸۲ (تیر/ک.ب.ت C)	-	-	۳۴ (تیر/ا.د F)
-	-	۸۳ (مرداد/ک.ب.ت C)	-	-	۳۵ (مرداد/ا.د F)
-	-	۸۴ (شهریور/ک.ب.ت C)	-	-	۳۶ (شهریور/ا.د F)
-	-	۸۵ (فروردین/ ک.ب.ت D)	-	-	۳۷ (فروردین/ا.د G)

-	-	۸۶ (اردیبهشت/ک.ت.د)	Trichothecium	Trichothecium	۳۸ (اردیبهشت/ اد G)
-	-	۸۷ (خرداد/ک.ت.د)	-	-	۳۹ (خرداد/ اد G)
Aspergillus flavus	Aspergillus flavus	۸۸ (تیر/ک.ت.د)	-	-	۴۰ (تیر/ اد G)
-	-	۸۹ (مرداد/ک.ت.د)	-	-	۴۱ (مرداد/ اد G)
-	-	۹۰ (شهریور/ک.ت.د)	-	-	۴۲ (شهریور/ اد G)
-	-	۹۱ (فروردین/ک.ت.د)	-	-	۴۳ (فروردین/ ام ^۲ A)
-	-	۹۲ (اردیبهشت/ک.ت.د)	-	-	۴۴ (ادیبهشت/ ام ^۱ A)
Aspergillus flavus	Aspergillus flavus	۹۳ (خرداد/ک.ت.د)	-	-	۴۵ (خرداد/ ام ^۱ A)
-	-	۹۴ (تیر/ک.ت.د)	-	-	۴۶ (تیر/ ام ^۱ A)
-	-	۹۵ (مرداد/ک.ت.د)	-	-	۴۷ (مرداد/ ام ^۱ A)
-	-	۹۶ (شهریور/ک.ت.د)	-	-	۴۸ (شهریور/ ام ^۱ A)

^۱ = استخر پرورشی دومانظوره و ذخیره آب کشاورزی
^۲ = استخر پرورشی منفرد
 تهران
^۳ = استخر پرورشی سد خاکی

۳-۱-۲ : نتایج مربوط به اندازه گیری آفلاتوکسین به روش الیزا در نمونه های خوراک ماهیان سردآبی:

پس از انجام آزمایشات مربوط به اندازه گیری مقادیر آفلاتوکسین در نمونه های اخذ شده (توضیح داده شده در فصل دوم) نتایج ذیل (که در جداول شماره ۳-۱-۲، ۳-۲-۱، ۳-۲-۲ و ۳-۱-۳-۴ به تفکیک به آن ها اشاره شده است) حاصل آمد:

جدول ۳-۱-۲ : نتایج اندازه گیری مقادیر آفلاتوکسین توتال بر حسب ppb در نمونه های اخذ شده از استخرهای پرورشی ماهی قزل آلاي رنگین کمان دومانظوره و ذخیره آب کشاورزی استان آذربایجان غربی در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶

نوع مزرعه پرورشی (دومانظوره و ذخیره آب کشاورزی)	ماه برداشت نمونه (در سال ۱۳۸۶)	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۱ بر حسب ppb	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۲ بر حسب ppb
الف	فروردین	۵/۸	۵
الف	اردیبهشت	۴/۲	۴

۴/۵	۴/۲	خرداد	الف	۳
۹/۸	۹/۸	تیر	الف	۴
۳/۵	۳/۹	مرداد	الف	۵
۶/۸	۷/۱	شهریور	الف	۶
۹	۹/۸	فروردین	ب	۷
۹/۸	۹/۸	اردیبهشت	ب	۸
۴/۵	۲/۱	خرداد	ب	۹
۷	۷/۲	تیر	ب	۱۰
۶/۸	۶	مرداد	ب	۱۱
۸/۵	۸/۲	شهریور	ب	۱۲
۴/۵	۴/۹	فروردین	ج	۱۳
۸	۶/۶	اردیبهشت	ج	۱۴
۸/۵	۷	خرداد	ج	۱۵
۷/۱	۷/۸	تیر	ج	۱۶
۶	۴/۸	مرداد	ج	۱۷
۱۱	۹/۶	شهریور	ج	۱۸
۴/۶	۳/۹	فروردین	د	۱۹
۸	۸	اردیبهشت	د	۲۰
۴/۹	۶	خرداد	د	۲۱
۱۱	۱۱	تیر	د	۲۲
۶/۸	۶/۹	مرداد	د	۲۳
۴/۲	۳/۹	شهریور	د	۲۴
۴/۵	۴	فروردین	ه	۲۵
۶/۵	۶/۴	اردیبهشت	ه	۲۶
۷	۷/۴	خرداد	ه	۲۷
۷/۸	۷	تیر	ه	۲۸
۸	۸	مرداد	ه	۲۹
۷	۷	شهریور	ه	۳۰
۵/۲	۴	فروردین	و	۳۱
۴/۲	۳	اردیبهشت	و	۳۲
۴/۵	۵	خرداد	و	۳۳
۵/۹	۵/۹	تیر	و	۳۴
۲/۸	۳	مرداد	و	۳۵
۵/۲	۴/۹	شهریور	و	۳۶
۵/۲	۵/۸	فروردین	ح	۳۷
۸	۷/۸	اردیبهشت	ح	۳۸
۳/۳	۳/۳	خرداد	ح	۳۹
۸/۵	۸	تیر	ح	۴۰
۶	۵/۹	مرداد	ح	۴۱
۴/۵	۳	شهریور	ح	۴۲

جدول ۳-۲-۱: نتایج اندازه گیری مقادیر آفلاتوکسین توتال بر حسب ppb در نمونه های اخذ شده از استخرهای پرورشی ماهی قزل آلاي رنگين کمان منفرد استان آذربايجان غربی در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶

ردیف	نوع مزرعه (منفرد)	ماه برداشت نمونه (در سال ۱۳۸۶)	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۱ بر حسب ppb	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۲ بر حسب ppb
۱	الف	فروردین	۳/۸	۴/۵
۲	الف	اردیبهشت	۴/۳	۴/۳
۳	الف	خرداد	۵	۵
۴	الف	تیر	۳	۴/۵
۵	الف	مرداد	۲/۲	۴/۵
۶	الف	شهریور	۷	۸
۷	ب	فروردین	۳/۸	۴/۵
۸	ب	اردیبهشت	۴/۱	۴/۸
۹	ب	خرداد	۳/۱	۴/۵
۱۰	ب	تیر	۶/۸	۸
۱۱	ب	مرداد	۲/۷	۴/۱
۱۲	ب	شهریور	۴/۸	۴/۱

جدول ۳-۲-۲: نتایج اندازه گیری مقادیر آفلاتوکسین توتال بر حسب ppb در نمونه های اخذ شده از استخرهای پرورشی ماهی قزل آلاي رنگين کمان سد خاکی استان آذربايجان غربی در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶

ردیف	نوع مزرعه (سدخاکی)	ماه برداشت نمونه (در سال ۱۳۸۶)	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۱ بر حسب ppb	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۲ بر حسب ppb
۱	الف	فروردین	۸/۲	۶/۵
۲	الف	اردیبهشت	۷	۸
۳	الف	خرداد	۹/۶	۹/۱
۴	الف	تیر	۷/۸	۷/۸
۵	الف	مرداد	۵/۱	۶
۶	الف	شهریور	۲/۱	۳/۸

جدول ۳-۲-۳: نتایج اندازه گیری مقادیر آفلاتوکسین توتال بر حسب ppb در نمونه های اخذ شده از کارخانجات تولید خوراک آبزیان استان های آذربايجان غربی و تهران در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶

ردیف	کارخانه خوراک آبزیان	ماه برداشت نمونه (در سال ۱۳۸۶)	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۱ بر حسب ppb	مقدار آفلاتوکسین توتال نمونه ۲ بر حسب ppb
۱	الف (آذربايجان غربی)	فروردین	۹/۸	۹
۲	الف (آذربايجان غربی)	اردیبهشت	۷/۱	۷/۸
۳	الف (آذربايجان غربی)	خرداد	۸/۹	۹/۲

۴	الف (آذربایجان غربی)	تیر	۶	۶/۵
۵	الف (آذربایجان غربی)	مرداد	۷	۷/۴
۶	الف (آذربایجان غربی)	شهریور	۵/۱	۴/۸
۷	ب (تهران)	فروردین	۷/۵	۶/۵
۸	ب (تهران)	اردیبهشت	۱۲/۵	۱۲/۵
۹	ب (تهران)	خرداد	۱۲	۱۲/۵
۱۰	ب (تهران)	تیر	۴/۵	۴
۱۱	ب (تهران)	مرداد	۷	۷
۱۲	ب (تهران)	شهریور	۷	۷/۵
۱۳	ج (تهران)	فروردین	۶/۵	۶
۱۴	ج (تهران)	اردیبهشت	۱۲/۵	۱۲
۱۵	ج (تهران)	خرداد	۷/۵	۸/۵
۱۶	ج (تهران)	تیر	۱۲/۵	۱۰/۵
۱۷	ج (تهران)	مرداد	۱۲/۵	۱۲
۱۸	ج (تهران)	شهریور	۵/۵	۵/۵
۱۹	د (تهران)	فروردین	۸/۵	۸
۲۰	د (تهران)	اردیبهشت	۹/۵	۹/۵
۲۱	د (تهران)	خرداد	۸	۸/۵
۲۲	د (تهران)	تیر	۱۶	۱۳/۵
۲۳	د (تهران)	مرداد	۱۲	۱۲/۵
۲۴	د (تهران)	شهریور	۱۱	۱۱
۲۵	ه (تهران)	فروردین	۸	۸/۵
۲۶	ه (تهران)	اردیبهشت	۸/۵	۷/۵
۲۷	ه (تهران)	خرداد	۸/۵	۸
۲۸	ه (تهران)	تیر	۱۲	۱۲/۵
۲۹	ه (تهران)	مرداد	۹	۸/۵
۳۰	ه (تهران)	شهریور	۷	۷/۵
۳۱	و (تهران)	فروردین	۸/۵	۸
۳۲	و (تهران)	اردیبهشت	۹/۵	۹/۵
۳۳	و (تهران)	خرداد	۱۰	۱۰/۵
۳۴	و (تهران)	تیر	۱۰/۵	۹/۵
۳۵	و (تهران)	مرداد	۵	۴/۵
۳۶	و (تهران)	شهریور	۱۲	۱۲

۲-۳ : تجزیه و تحلیل آماری داده ها :

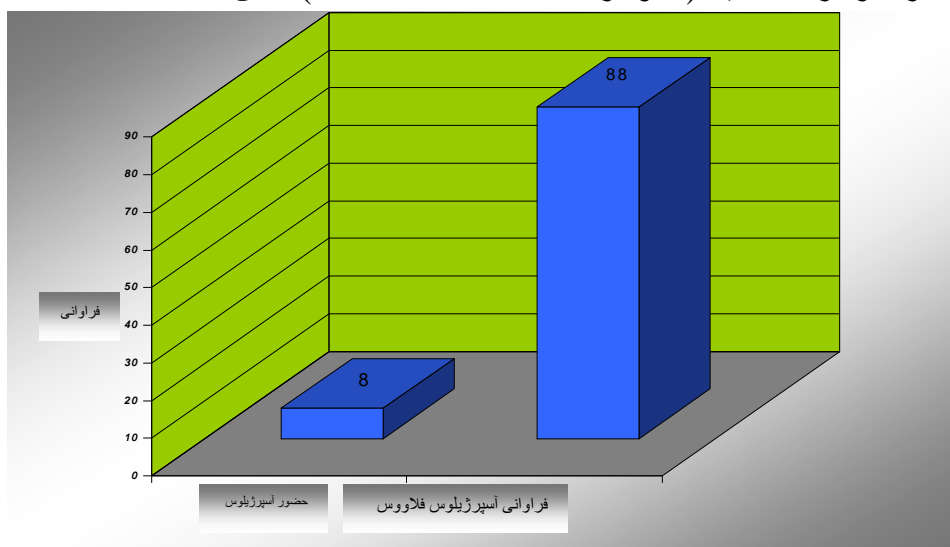
همان طور که در مقدمه رساله اشاره شد، از شاخص های آمار توصیفی (میانگین ، فراوانی، استاندارد ارور، نمودار و...) جهت تنظیم، تلخیص و به عرضه نمایش درآوردن داده ها در راستای تحلیل سؤالات پژوهش و نیز آزمون های معنی دار استنباطی تی- تست گروه های مستقل، کا- اسکویر یا آزمون خی (Chi-Square) و... با بهره گیری از بسته آماری یا نرم افزار spss. Ver. 16 و Excel 2003 استفاده شده است.

۱-۲-۳ : تحلیل توصیفی داده ها :

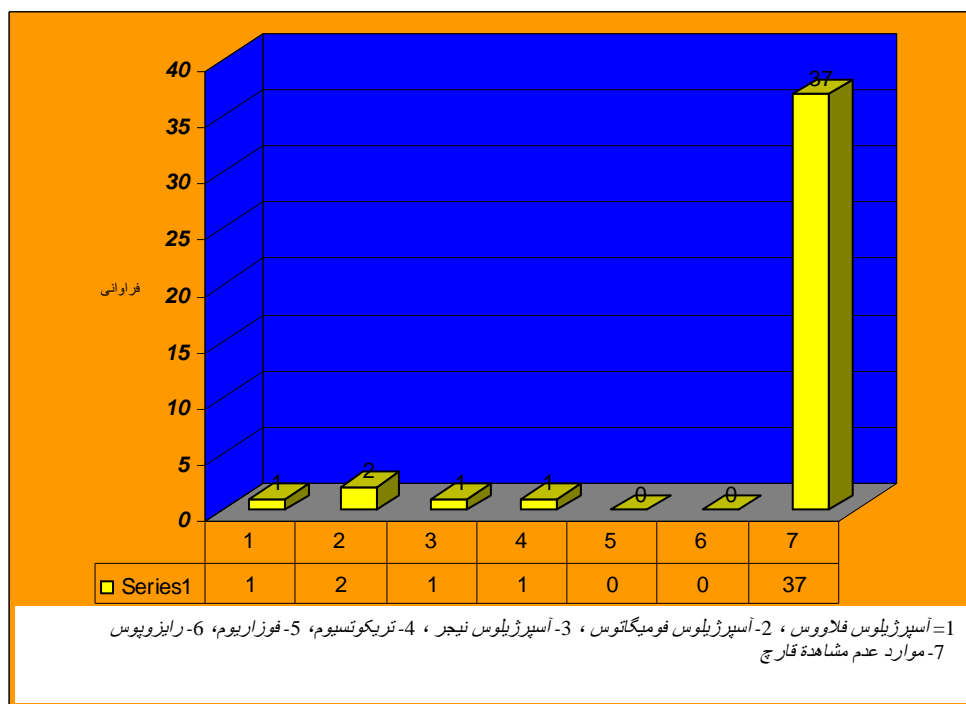
بر اساس یافته های جدول ۱-۱-۳ در خصوص بررسی حضور عوامل قارچی موجود در نمونه های خوراک ماهی قزل آلا در دو استان آذربایجان غربی و تهران در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶ (در دو محیط کشت M.E.A. و S.D.A.) ، از گونه های آفلاتوکسین زای *Aspergillus flavus* و *Asp. parasiticus* ، فقط ۸ مورد آلودگی به *آسپرژیلوس فلاووس* مشاهده گردیده و هیچ آلودگی از *آسپرژیلوس پارازایتیکوس* مشاهده نشده است.

بنابراین در ۹۱/۷ درصد نمونه های مورد مطالعه عامل *آسپرژیلوس فلاووس* مشاهده نگردیده است و فقط در ۸/۳ درصد نمونه ها این عامل مشاهده شده است. لازم به ذکر است که *آسپرژیلوس پارازایتیکوس* در هیچ کدام از نمونه ها یافت نشد.

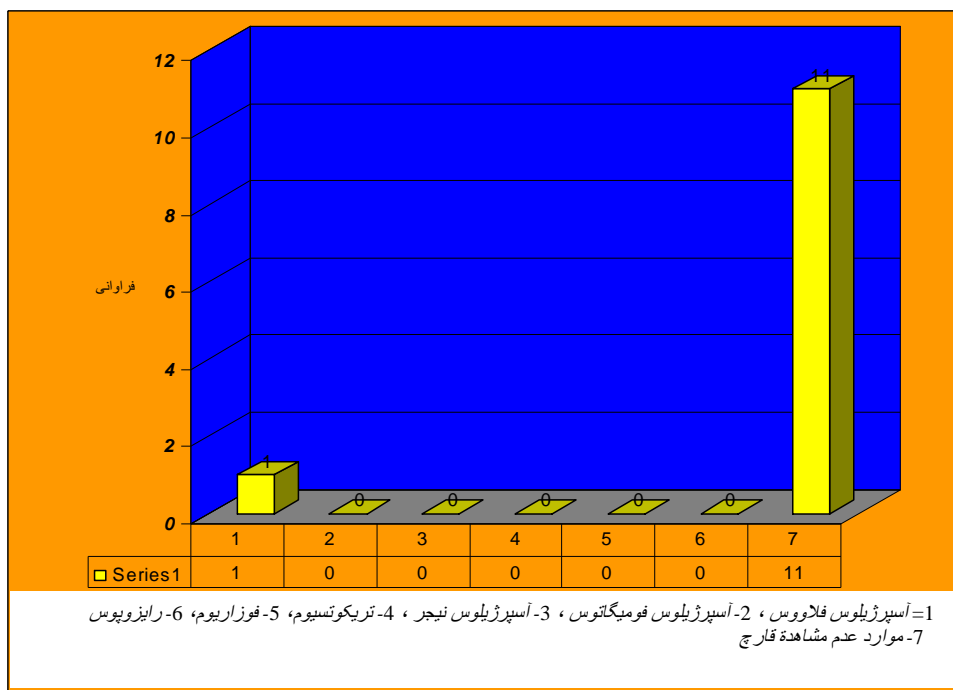
این نتیجه در نمودار های ذیل (نمودار ۱-۱-۲-۳ تا ۱-۱-۲-۶) نشان داده شده است.



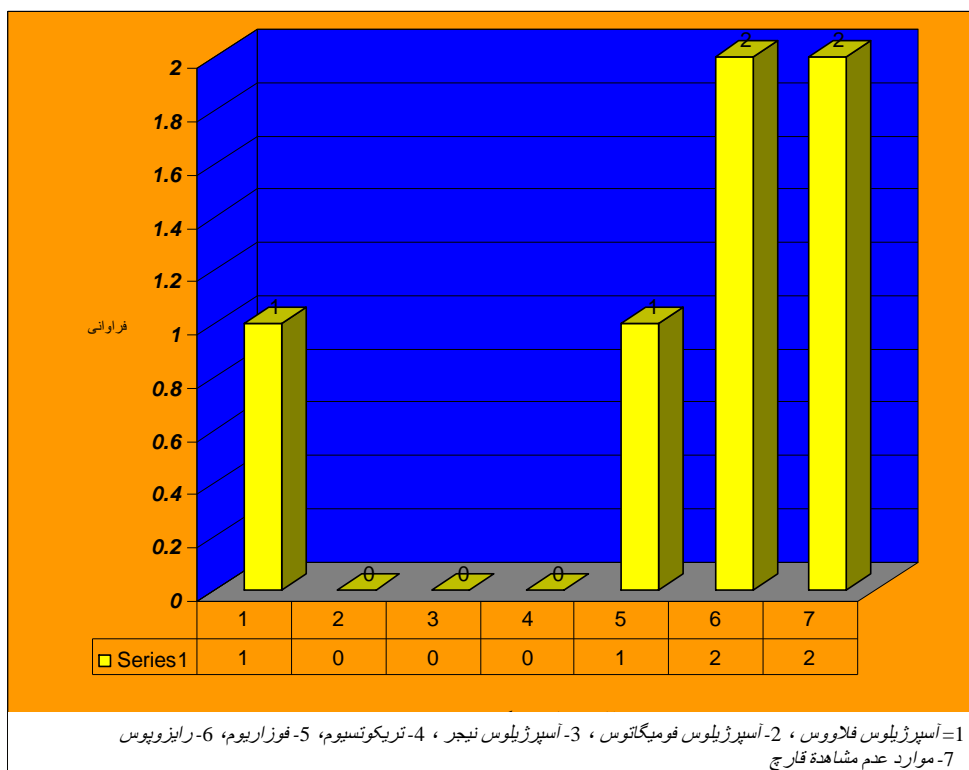
نمودار ۱-۱-۲-۳: نمودار فراوانی *آسپرژیلوس فلاووس* جداسازی شده از ۹۶ نمونه خوراک ماهیان



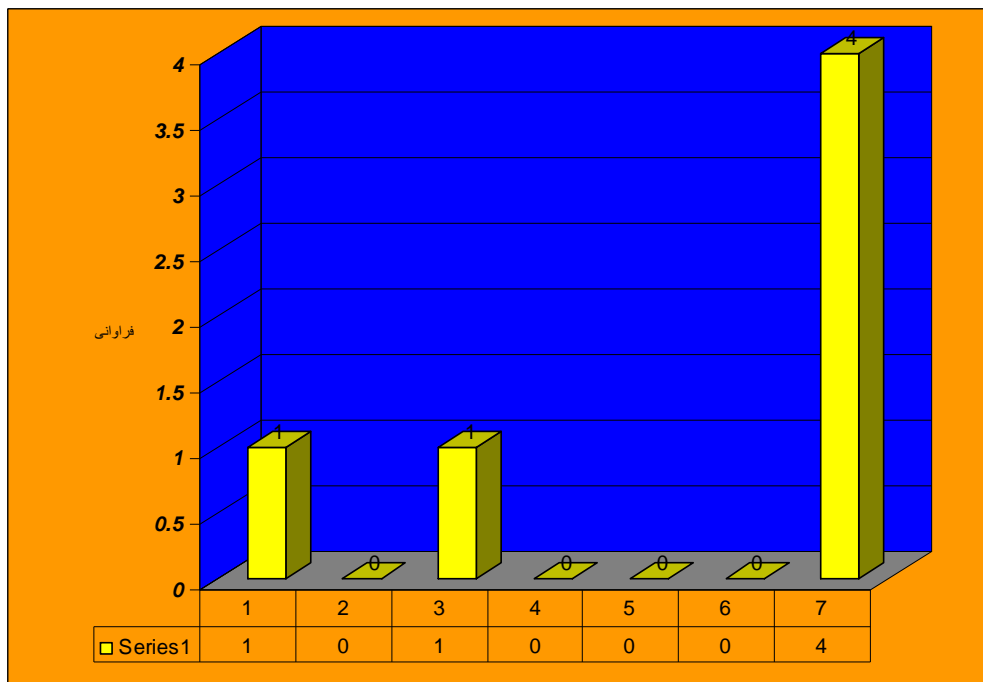
نمودار ۲-۱-۲-۳: نمودار فراوانی انواع قارچ های جداسازی شده از ۴۲ نمونه خوراک استخر های پرورشی دومنظوره و ذخیره آب کشاورزی استان آذربایجان غربی



نمودار ۳-۱-۲-۳ : نمودار فراوانی انواع قارچ های جداسازی شده از ۱۲ نمونه خوراک استخر های پرورشی منفرد استان آذربایجان غربی

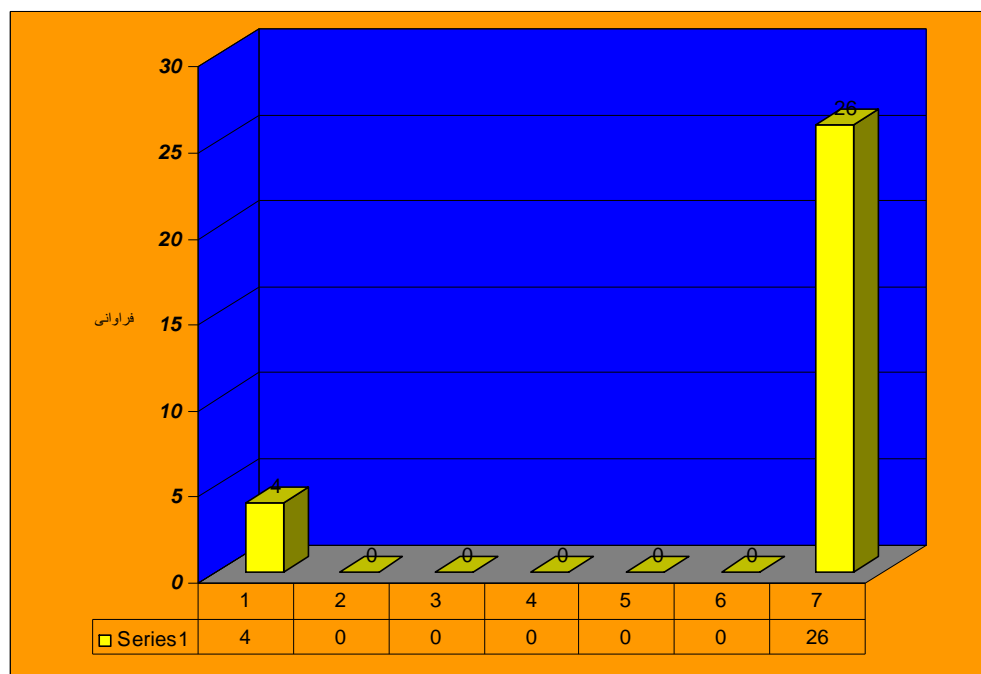


نمودار ۴-۱-۲-۳ : نمودار فراوانی انواع قارچ های جداسازی شده از ۶ نمونه خوراک استخر پرورشی سدخاکی استان آذربایجان غربی



1=آسپرژیلوس فلاووس ، 2-آسپرژیلوس فومیگاتوس ، 3-آسپرژیلوس نیجر ، 4-تریکوتسیوم، 5-فوزاریوم، 6-رایزوپوس
7- موارد عدم مشاهده قارچ

نمودار ۳-۲-۱-۵ : نمودار فراوانی انواع قارچ های جداسازی شده از ۶ نمونه کارخانه تولید خوراک آبزیان استان آ. غربی

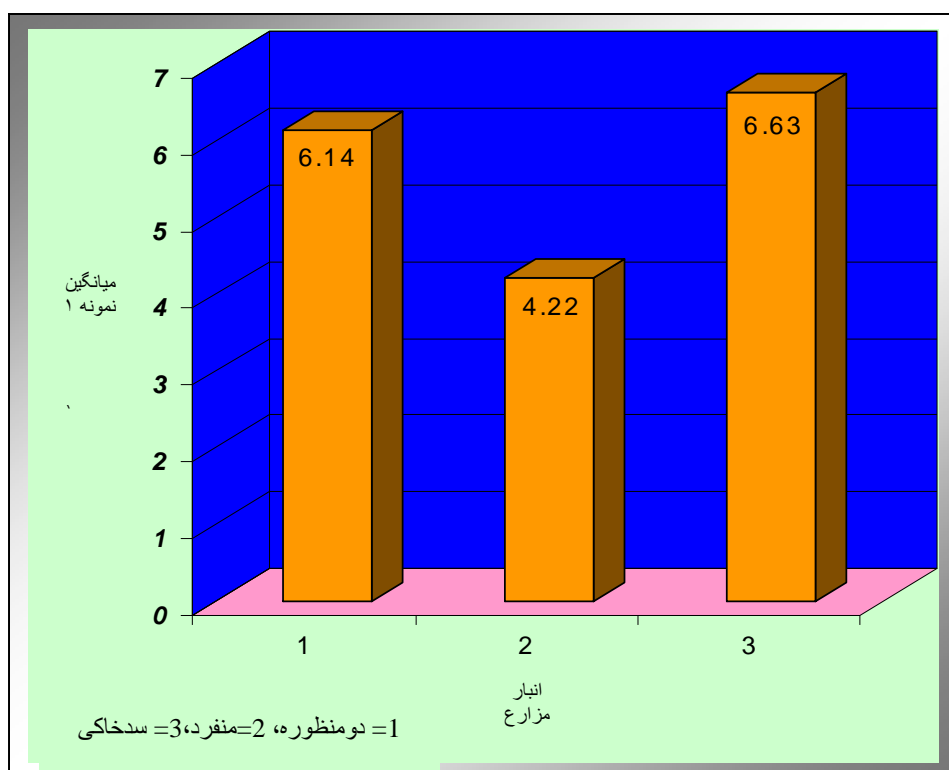


1=آسپرژیلوس فلاووس ، 2-آسپرژیلوس فومیگاتوس ، 3-آسپرژیلوس نیجر ، 4-تریکوتسیوم، 5-فوزاریوم، 6-رایزوپوس
7- موارد عدم مشاهده قارچ

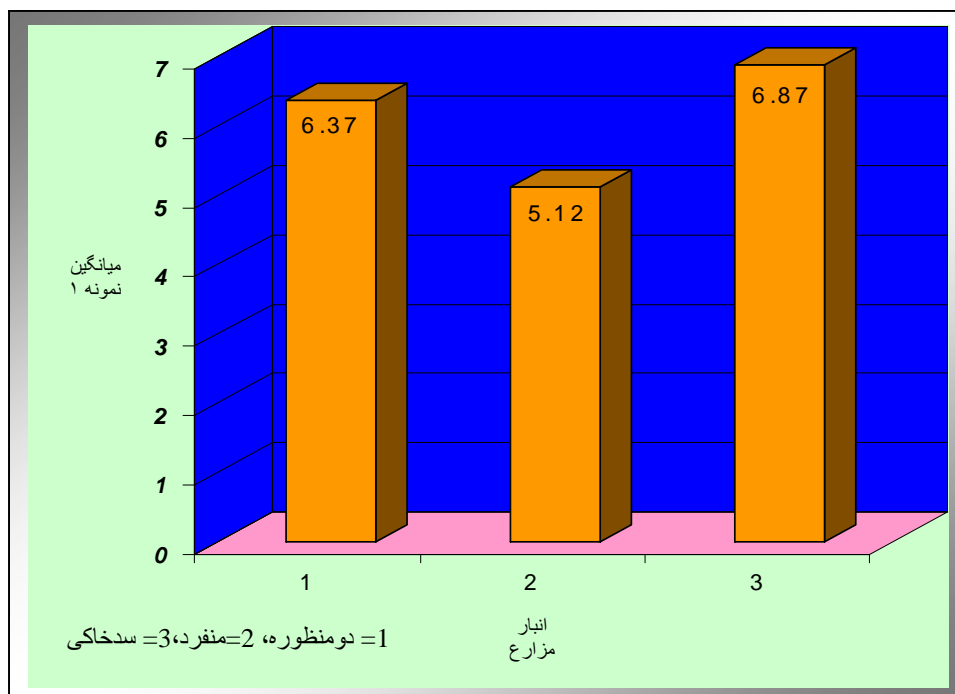
نمودار ۳-۲-۱-۶ : نمودار فراوانی انواع قارچ های جداسازی شده از ۳۰ نمونه کارخانه تولید خوراک آبزیان استان تهران

بر اساس یافته های جداول ۱-۲-۱-۳ تا ۴-۲-۱-۳ در خصوص بررسی حضور و مقادیر آفلاتوکسین توتال موجود در نمونه های خوراک ماهی قزل آلا در دو استان آذربایجان غربی و تهران در فصول بهار و تابستان ۱۳۸۶، موارد ذیل قابل بحث است :

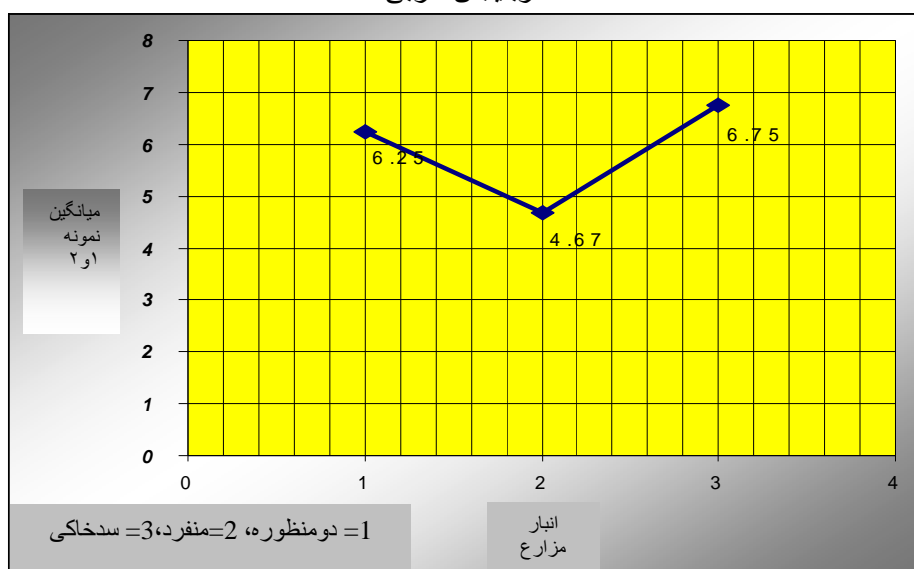
میانگین مقدار آفلاتوکسین توتال در نمونه های ۱ و ۲ مورد مطالعه برداشت شده در مزارع دومنظوره و ذخیره آب کشاورزی و سد خاکی در دامنه ۶/۱ الی ۶/۸ بوده و تفاوتی زیادی با هم ندارند، ولی با میانگین این عامل در مزارع منفرد که در دامنه ۴ الی ۵ می باشد، دارای تفاوت ظاهری می باشند. نمودارهای ذیل (۱-۲-۳ تا ۹) این مطلب را به خوبی نشان می دهد.



نمودار ۱-۲-۳ : نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ خوراک انبار سه تیپ مزرعه پرورشی استان آذربایجان غربی

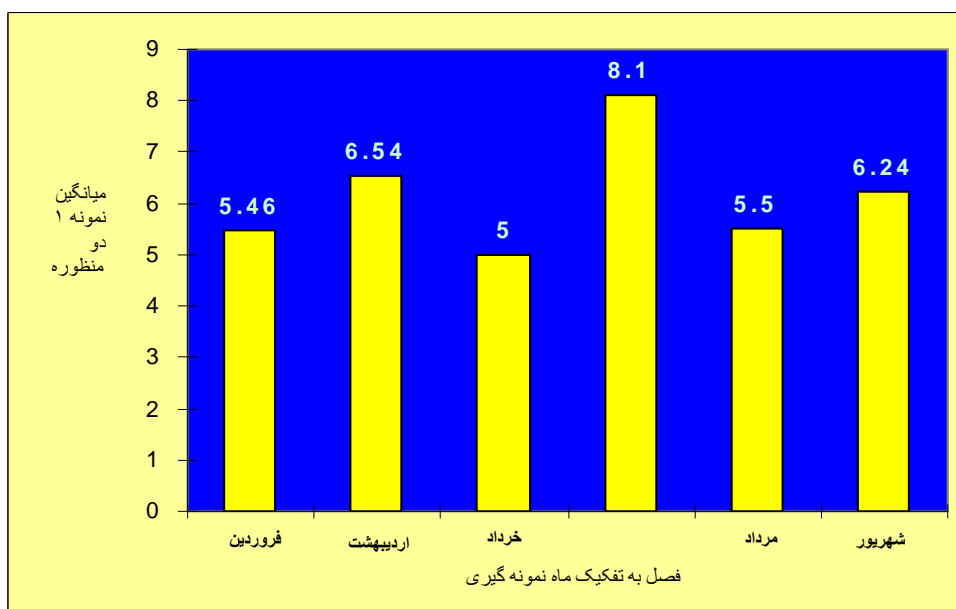


نمودار ۱-۲-۳ : نمودار مقایسه میانگین آفاتوکسین توتال نمونه های ۲ خوراک انبار سه تیپ مزرعه پرورشی استان آذربایجان غربی

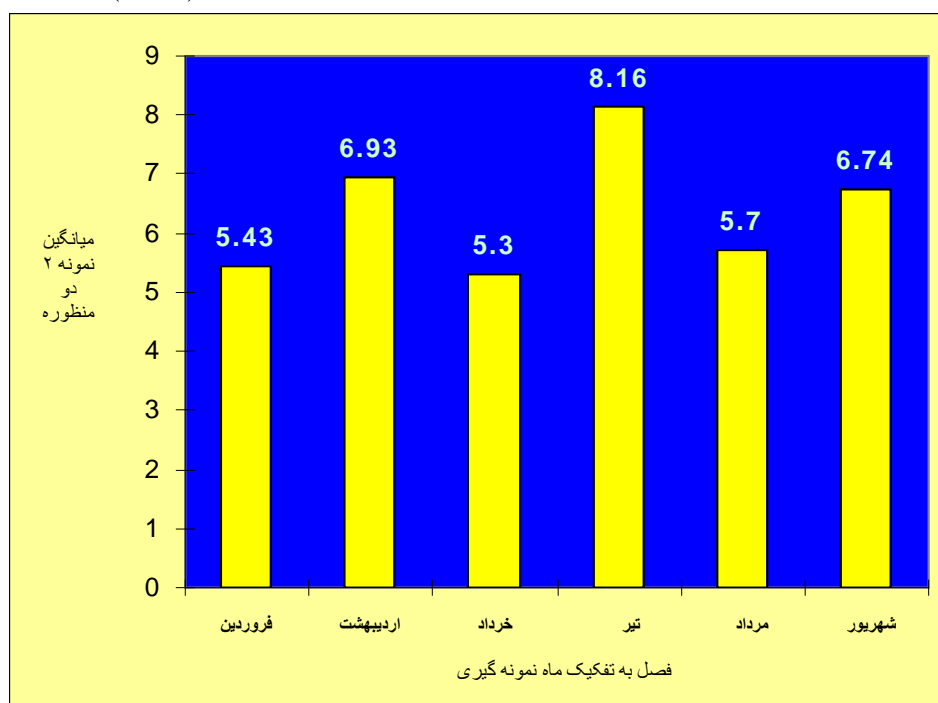


نمودار ۱-۲-۳ : نمودار مقایسه میانگین آفاتوکسین توتال نمونه های ۱ و ۲ خوراک انبار سه تیپ مزرعه پرورشی استان آذربایجان غربی

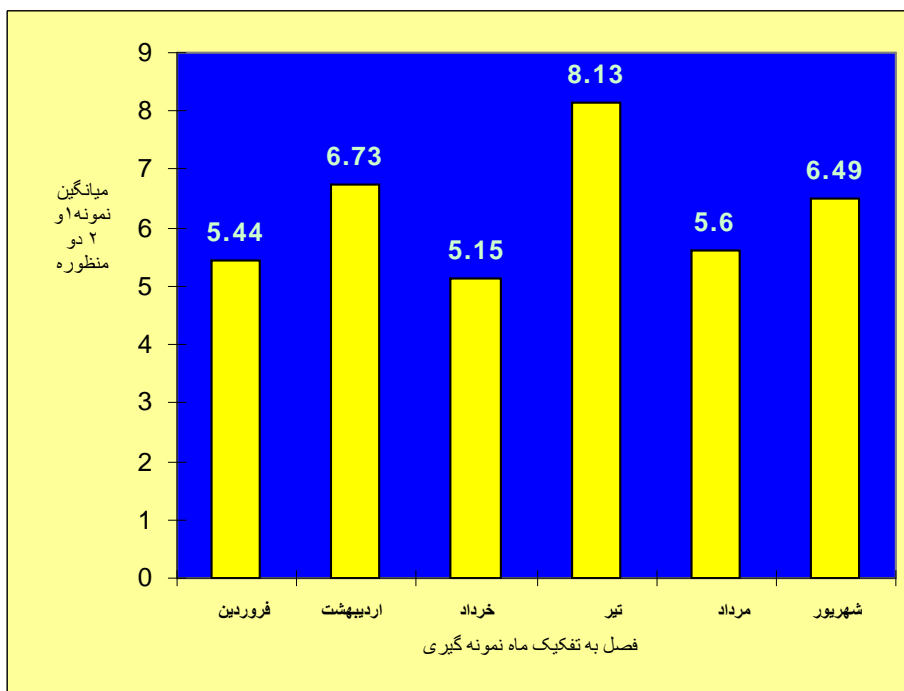
به منظور بررسی مقادیر آفاتوکسین توتال در خوراک انباری مزارع دو منظوره پرورش ماهی قزل آلا استان آذربایجان غربی، در فصول بهار و تابستان (فصول نمونه گیری) میانگین این مقادیر در ماه های مختلف بر اساس جداول شماره ۱-۲-۳، در دو نمونه گرفته شده در هر بار نمونه گیری، مورد محاسبه قرار گرفت. بیشترین مقدار میانگین دو نمونه آفاتوکسین توتال در فصل تابستان و تیرماه با مقدار ۸/۱۳ ppb و همچنین کمترین مقدار نیز در خردادماه ماه با مقدار ۵/۱۵ ppb دیده شد (که در نمودار ۱-۲-۳ تا ۱۰ نشان داده شده است).



نمودار ۱۰-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ خوراک انبار مزارع پرورشی دومنظوره ماهیان سردابی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)

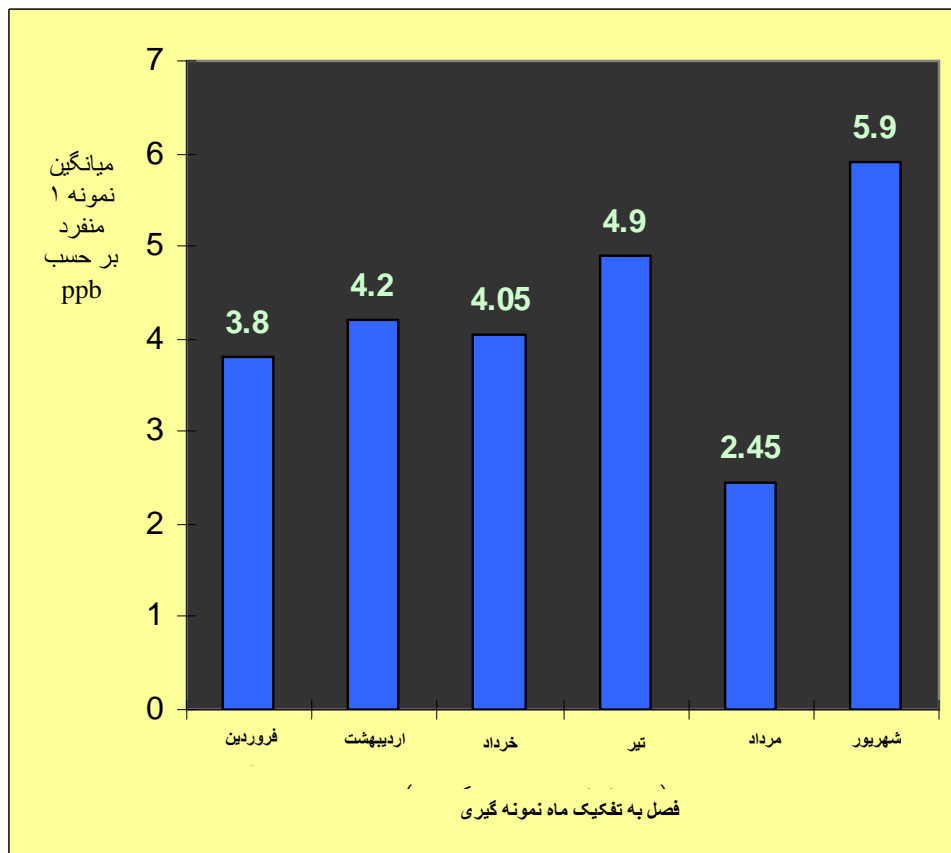


نمودار ۱۱-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۲ خوراک انبار مزارع پرورشی دومنظوره ماهیان سردابی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)

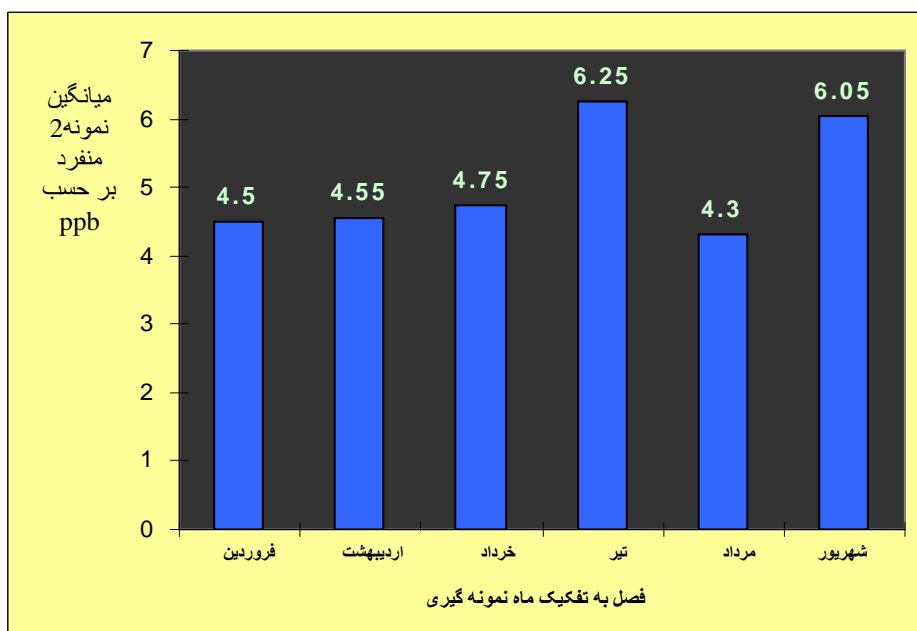


نمودار ۱۲-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ و ۲ خوراک انبار مزارع پرورشی دو منظوره ماهیان سردابی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)

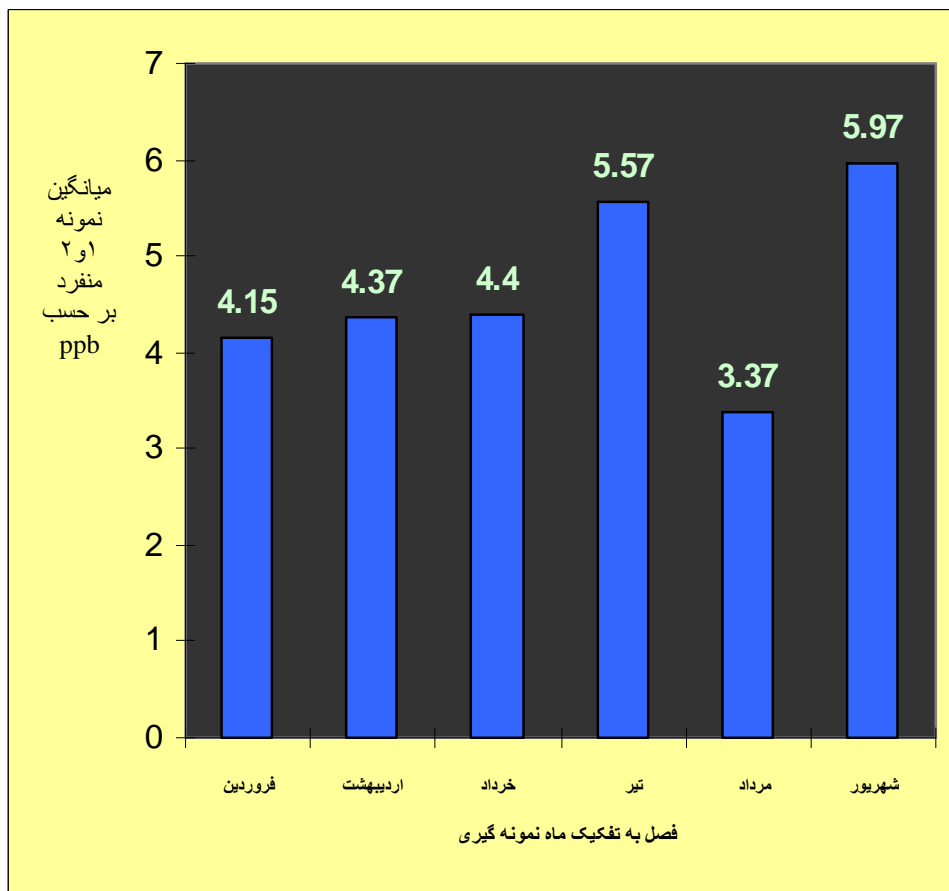
در همین راستا و جهت بررسی مقادیر آفلاتوکسین توتال در خوراک انباری استخرهای پرورشی منفرد ماهی قزل آلا استان آذربایجان غربی، در فصول بهار و تابستان میانگین این مقادیر در ماه های مختلف بر اساس جداول شماره ۱-۲-۳، در دو نمونه گرفته شده در هر بار نمونه گیری، مورد محاسبه قرار گرفت. بیشترین مقدار میانگین دو نمونه آفلاتوکسین توتال در فصل تابستان و شهریورماه ماه با مقدار ۵/۹۷ ppb و همچنین کمترین مقدار نیز در مرداد ماه با مقدار ۳/۳۷ ppb دیده شد (که در نمودار ۱۳-۱-۲-۳ تا ۱۵ نشان داده شده است).



نمودار ۱۳-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ خوراک انبار استخرهای پرورشی منفرد ماهیان سردآبی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)



نمودار ۱۴-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۲ خوراک انبار استخرهای پرورشی منفرد ماهیان سردآبی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)



نمودار ۱۵-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ و ۲ خوراک انبار استخرهای پرورشی منفرد ماهیان سردآبی استان آذربایجان غربی بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)

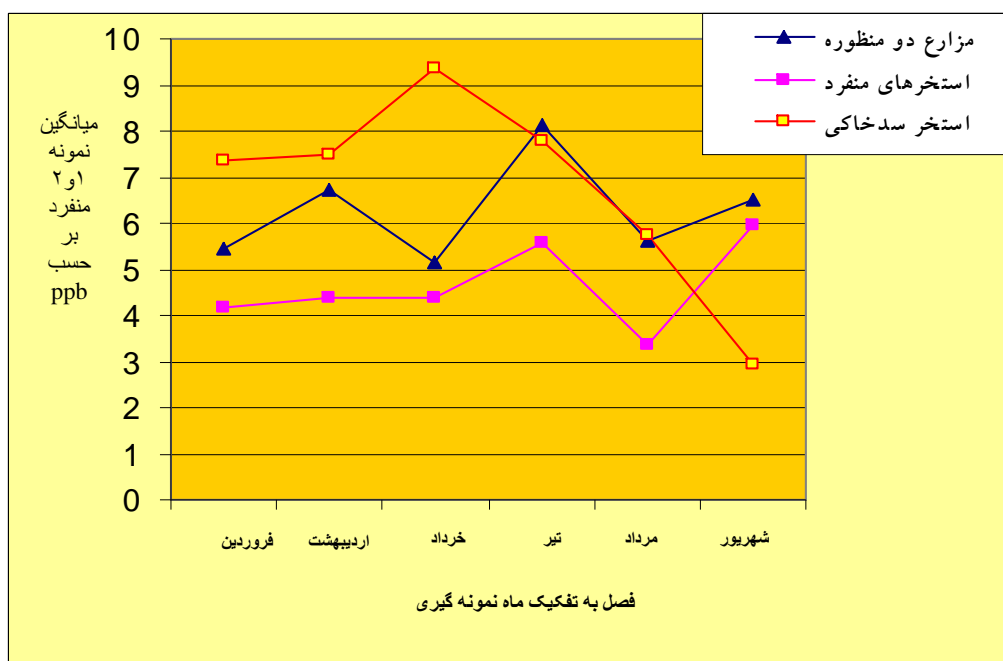
میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال نمونه های اخذ شده از سه تیپ مراکز پرورشی ماهیان قزل آلاي رنگین کمان (دومنظوره، منفرد و سدخاکی) استان آذربایجان غربی در دو فصل بهار و تابستان ۸۶، و همچنین بررسی میانگین مقادیر این عامل در طول دوره نمونه برداری در سه تیپ مرکز پرورشی، بر اساس جدول ذیل و نمودار های ۱۶-۱-۲-۳ و ۱۷-۱-۲-۳ مورد بررسی قرار گرفته است. آنچه مشخص است بالا بودن مقادیر آفلاتوکسین توتال در استخرهای سدخاکی در طول دوره نمونه برداری نسبت به دیگر مراکز پرورشی است. مقادیر این عامل در مراکز پرورشی در سه ماهه نخست سال (بهار) و تیرماه در سطح بالاتری نسبت به دو ماه آخر تابستان است.

جدول ۵-۱-۲-۳: مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال مراکز مختلف پرورشی در طول دوره نمونه برداری در دو فصل بهار و تابستان

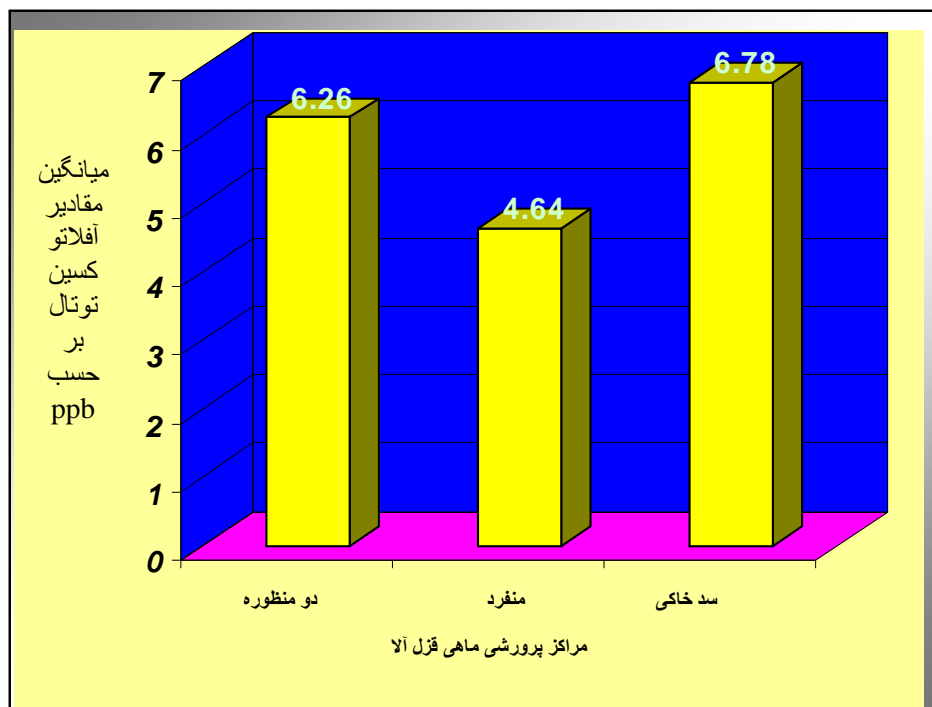
میانگین کل هر مزرعه	شهریور	مرداد	تیر	خرداد	اردیبهشت	فروردین	ماه های سال مراکز پرورشی
۶/۲۶	۶/۴۹	۵/۶	۸/۱۳	۵/۱۵	۶/۷۳	۶/۴۴۰	مزرعه دو منظوره

۴/۶۴	۵/۹۷	۳/۳۷	۵/۵۷	۴/۴	۴/۳۷	۴/۱۵	استخر منفرد
۶/۷۸	۲/۹۵	۵/۷۵	۷/۸	۹/۳۵	۷/۵	۷/۳۵	استخر سدخاکی
-	۵/۱۴	۴/۹۱	۷/۱۷	۶/۳	۶/۲	۵/۶۵	میانگین کل مزارع در هر ماه

* = کلیه مقادیر بر حسب ppb می باشد.

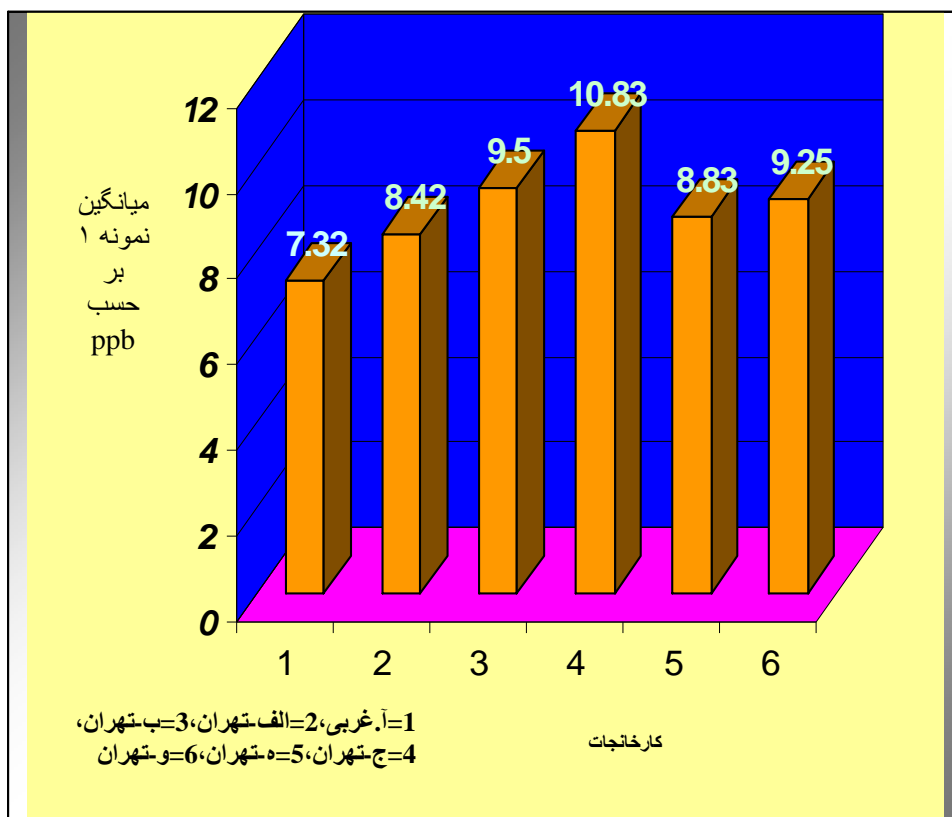


نمودار ۱۶-۱-۲-۳ : نمودار مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال مراکز مختلف پرورشی در طول دو فصل بهار و تابستان به تفکیک ماه نمونه برداری

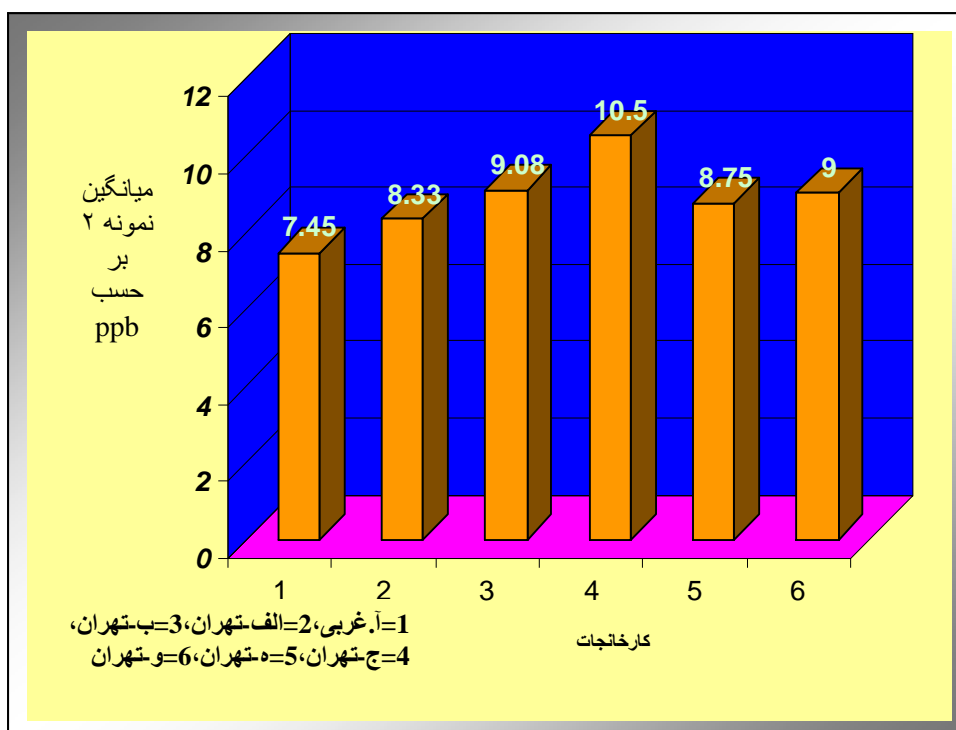


نمودار ۱۷-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال مراکز مختلف پرورشی در طول دوره نمونه برداری به تفکیک مراکز پرورشی استان آذربایجان غربی

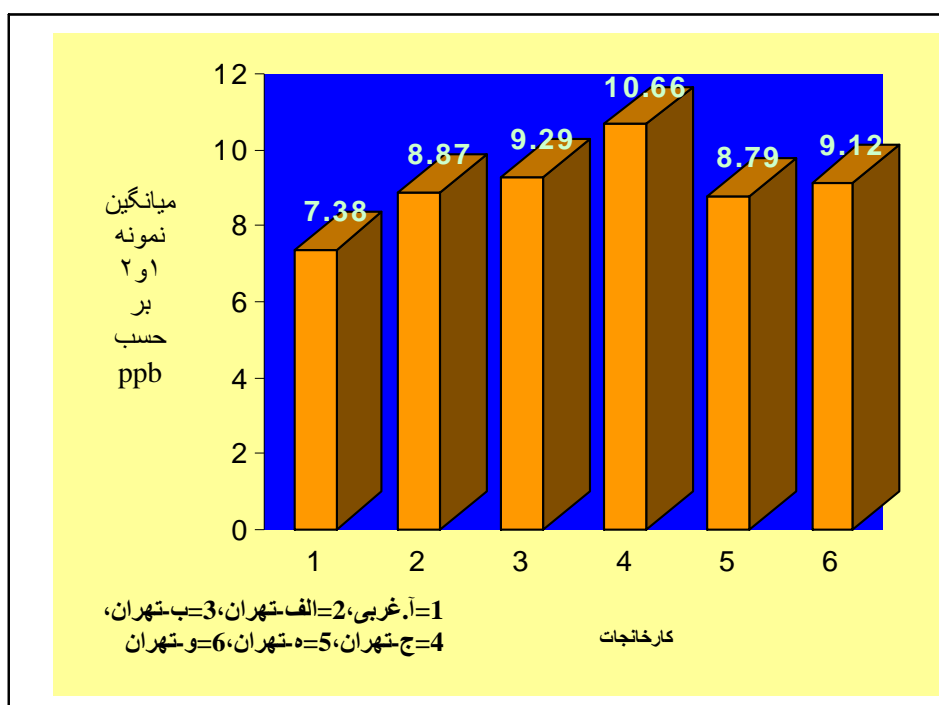
میانگین مقدار آفلاتوکسین توتال در نمونه های ۲۰۱ مورد مطالعه برداشت شده در کارخانجات تولید خوراک آبزیان استان آذربایجان غربی و تهران که در دامنه ۷/۳ الی ۹/۳۵ می باشد ، دارای تفاوت ظاهری می باشند. به بیانی دیگر با توجه به این یافته می توان ادعا نمود که میانگین یا شیوع عامل در کارخانجات استان آذربایجان غربی بیشتر از کارخانجات مربوط در استان تهران می باشد. البته بحث معنی داری تفاوت از لحاظ آماری در ادامه مورد بررسی قرار خواهد گرفت. نمودارهای ذیل (۱۸-۱-۲-۳ و ۲۰-۱-۲-۳) این مطلب را به خوبی نشان می دهد.



نمودار ۱۸-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران

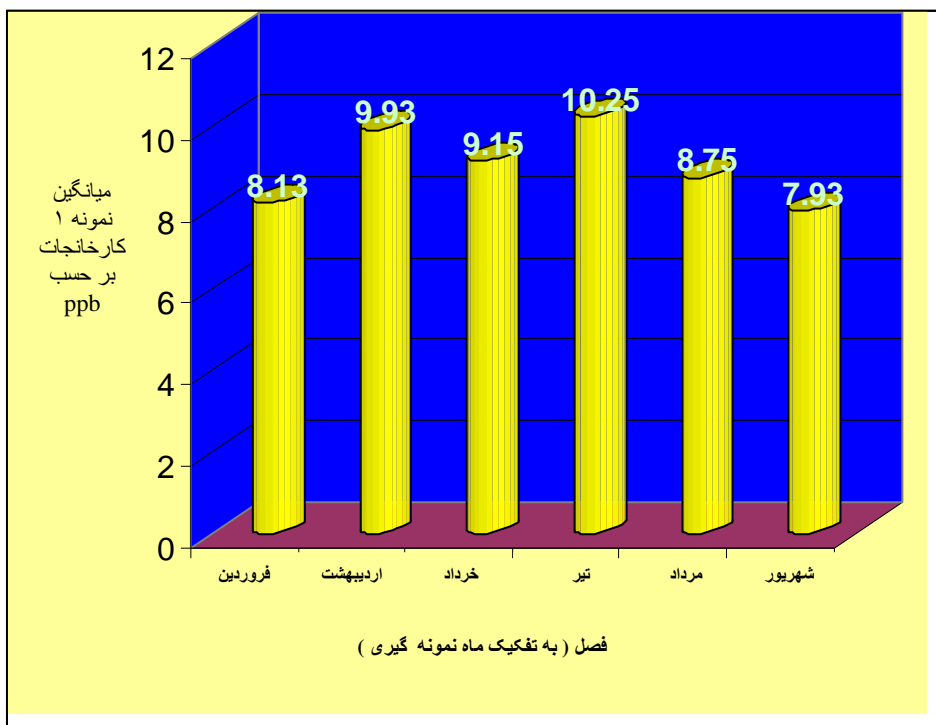


نمودار ۱۹-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۲ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران

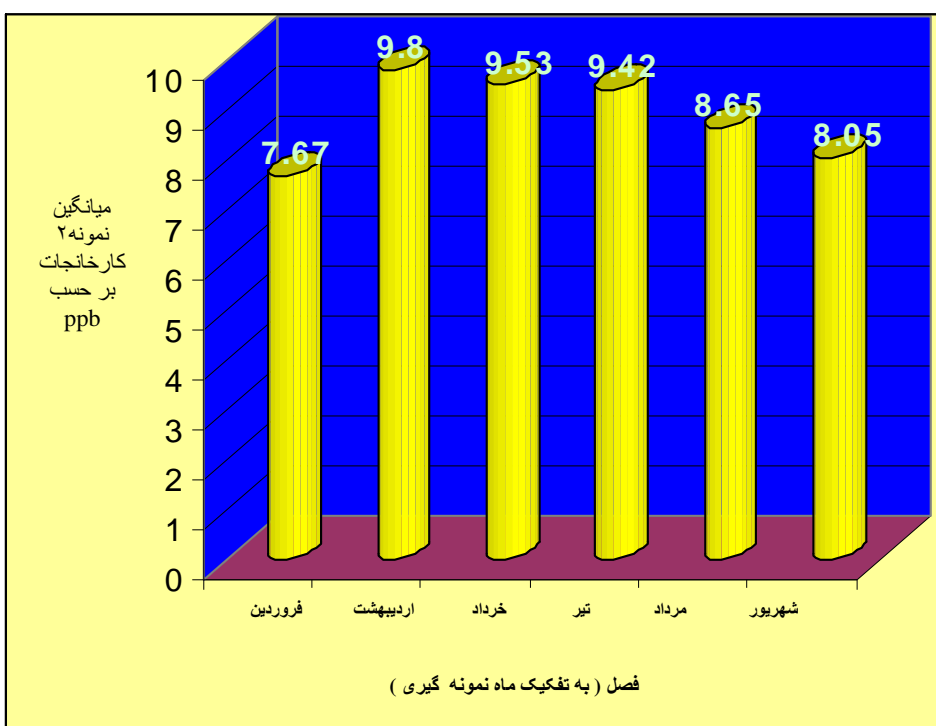


نمودار ۲-۱-۲۰: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ و ۲ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران

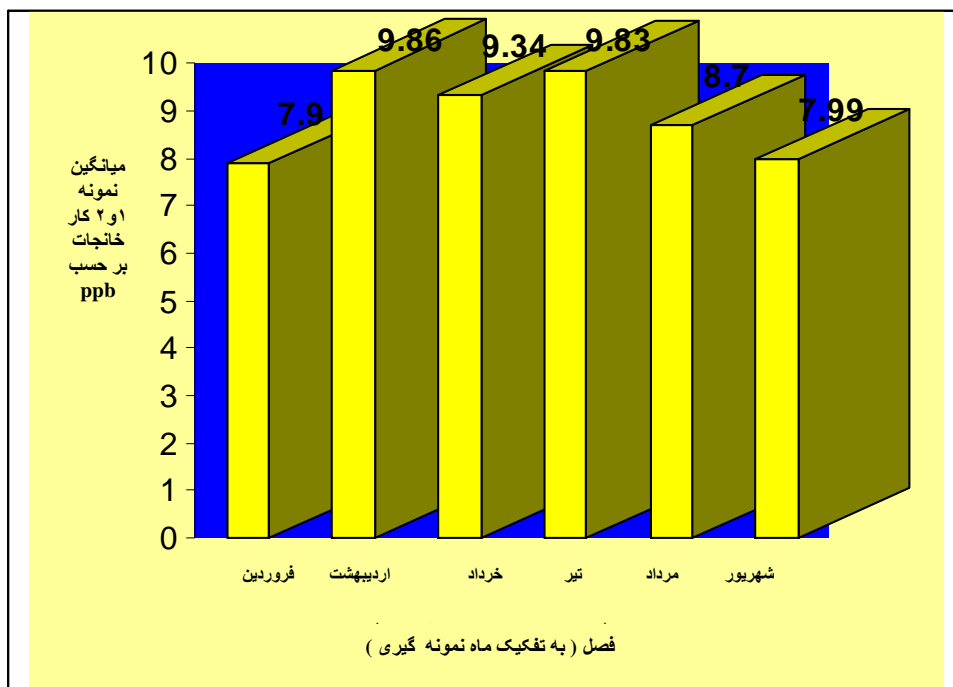
به منظور بررسی مقادیر آفلاتوکسین توتال در خوراک تولیدی کارخانجات استان های آذربایجان غربی و تهران، در فصول بهار و تابستان (فصول نمونه گیری) میانگین این مقادیر در ماه های مختلف بر اساس جداول شماره ۱-۲-۳-۴ در دو نمونه گرفته شده در هر بار نمونه گیری، به شکل جدول ذیل مورد محاسبه قرار گرفته است. بیشترین مقدار میانگین دو نمونه آفلاتوکسین توتال در فصل بهار و اردیبهشت ماه با مقدار ۹/۸۶ ppb و در فصل تابستان و تیرماه با مقدار ۱۰/۲۵ ppb و همچنین کمترین مقدار نیز در فروردین ماه با مقدار ۷/۹۰ ppb دیده شد(که در نمودار ۲-۱-۲۰ تا ۲۳ نشان داده شده است).



نمودار ۲۱-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۱ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)



نمودار ۲۲-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین آفلاتوکسین توتال نمونه های ۲ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)



نمودار ۲-۳-۱: نمودار مقایسه میانگین آفاتوکسین توتال نمونه های ۱ و ۲ خوراک کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران بر حسب ماه نمونه گیری (فصل)

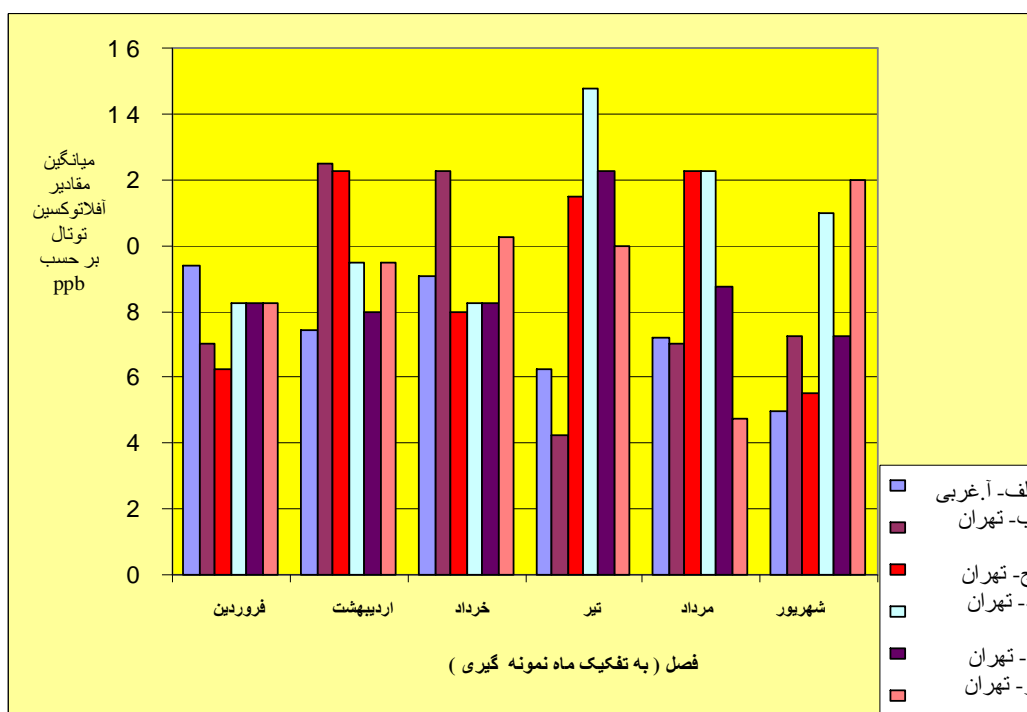
میانگین مقادیر آفاتوکسین توتال نمونه های اخذ شده از ۶ کارخانه تولید خوراک ماهیان سردابی استان های آذربایجان غربی و تهران در دو فصل بهار و تابستان ۸۶ ، و همچنین بررسی میانگین مقادیر این عامل در طول دوره نمونه برداری در آن کارخانجات، بر اساس نمودار های ۱-۲-۳ تا ۲۶ مورد بررسی قرار گرفت. آنچه مشخص است بالا بودن مقادیر آفاتوکسین توتال در کارخانجات تولید خوراک ماهیان در تهران نسبت به آذربایجان غربی در طول دوره نمونه برداری است.

جدول ۲-۳-۱: مقایسه میانگین مقادیر آفاتوکسین توتال کارخانجات تولید خوراک ماهیان سردابی در طول دوره نمونه برداری در دو فصل بهار و تابستان

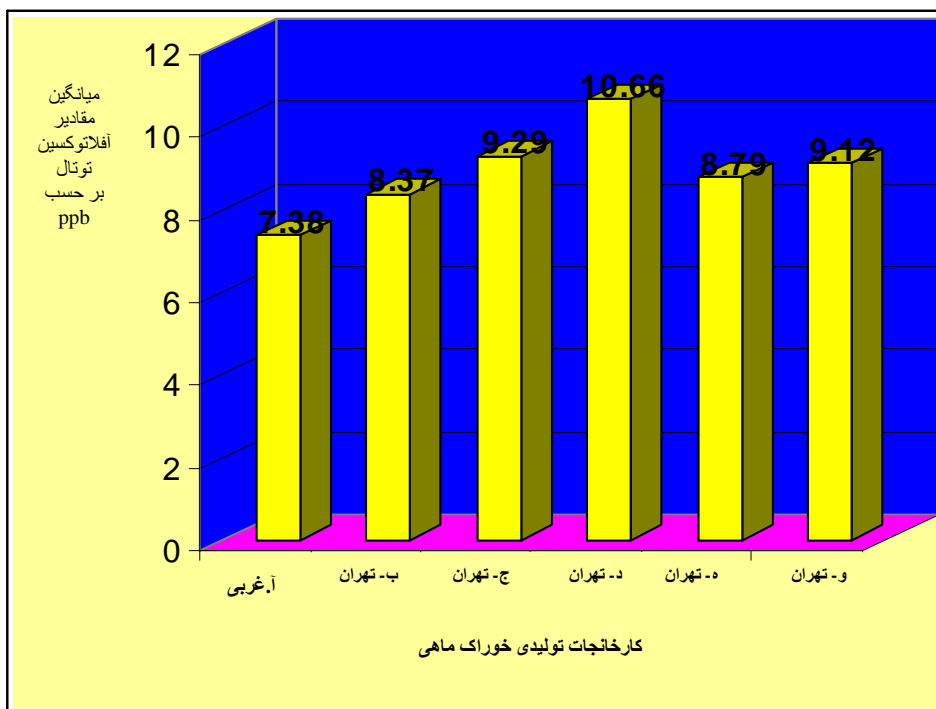
ماه های سال مراکز پرورشی	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	میانگین کل هر مزرعه
الف- آ. غربی	۹/۴۰	۷/۴۵	۹/۰۵	۶/۲۵	۷/۲	۴/۹۵	۷/۳۸
ب- تهران	۷	۱۲/۵	۱۲/۲۵	۶/۲۵	۷	۷/۲۵	۸/۳۷
ج- تهران	۶/۲۵	۱۲/۲۵	۸	۱۱/۵	۱۲/۲۵	۵/۵	۹/۲۹
د- تهران	۸/۲۵	۹/۵	۸/۲۵	۱۴/۷۵	۱۲/۲۵	۱۱	۱۰/۶۶

هـ- تهران	۸/۲۵	۸	۸/۲۵	۱۲/۲۵	۸/۷۵	۷/۲۵	۸/۷۹
و- تهران	۸/۲۵	۹/۵	۱۰/۲۵	۱۰	۴/۷۵	۱۲	۹/۱۲
میانگین کل مزارع در هر ماه	۷/۹	۹/۶۸	۹/۳۴	۹/۸۳	۸/۷	۷/۹۹	-

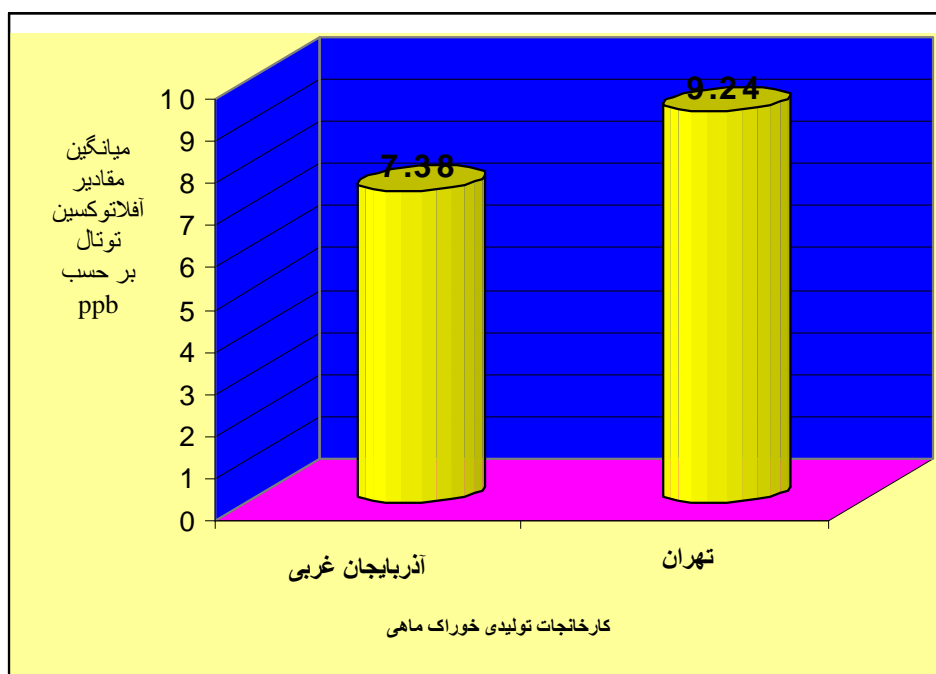
• = کلیه مقادیر بر حسب ppb می باشند.



نمودار ۱-۲-۳ : نمودار مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال کارخانجات مختلف تولید خوراک ماهیان سردابی در طول دو فصل بهار و تابستان به تفکیک ماه نمونه برداری



نمودار ۲۵-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال کارخانجات تولید خوراک ماهیان سردابی در طول دوره نمونه برداری به تفکیک کارخانجات تولیدی در استان های تهران و آذربایجان غربی



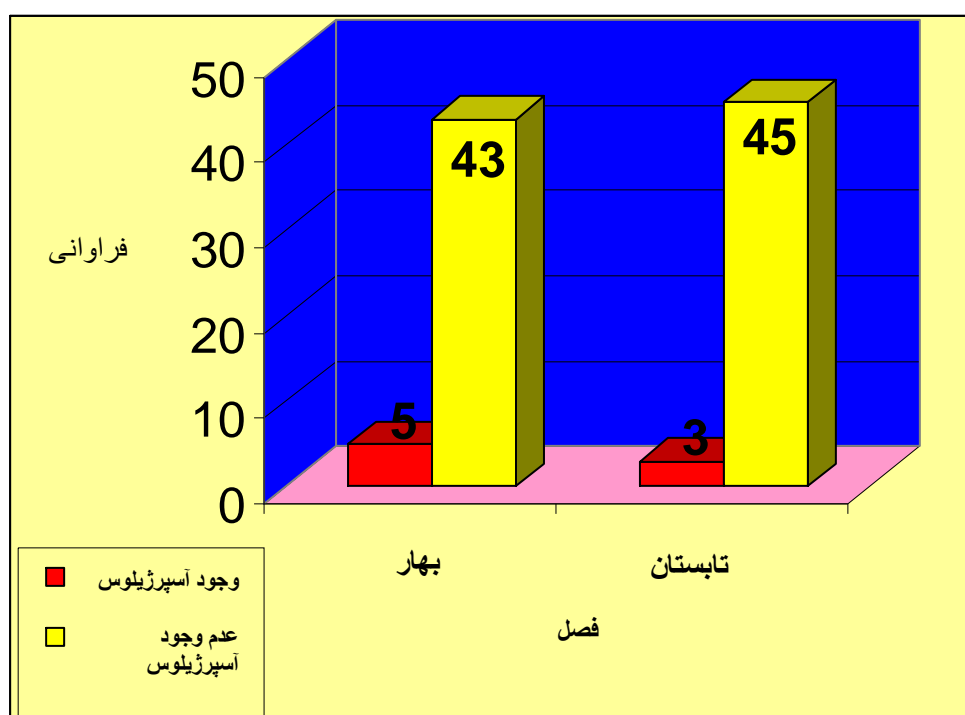
نمودار ۲۶-۱-۲-۳: نمودار مقایسه میانگین مقادیر آفلاتوکسین توتال به تفکیک کارخانجات تولیدی در استان های تهران و آذربایجان غربی

۲-۲-۳: تحلیل استنباطی داده ها :

قبل از پرداختن به تحلیل های مورد نظر، ذکر این نکته لازم است که بر اساس آزمون تی تک گروهی یافته های حاصل از مقادیر آفلاتوکسین توتال به تفکیک نوع مزارع، کارخانجات، فصل و ماه های سال در مطالعه حاضر در قالب نمونه های ۱ و ۲، بر اساس خروجی های spss، همگی پایین تر از سطوح تolerانس مشخص شده توسط کمیته مشترک WHO و FAO که در جدول شماره ۱-۳-۱ و ۱-۳-۲ بخش سوم فصل یک آمده است، می باشد. (میانگین میزان آفلاتوکسین توتال در تمامی یافته ها از ۱۱ ppb کمتر است). علی ایحال تحلیل های این مطالعه در قالب سؤالات تحقیق حاضر بر اساس یافته های موجود و بررسی وضعیت موجود (آن گونه که هست) صورت پذیرفته است.

الف- جهت بررسی رابطه بین میزان شیوع عامل آسپرژیلوس فلاووس با فصل، با توجه به اسمی بودن داده ها از آزمون خی دو یا کا- اسکویر مستقل استفاده شد.

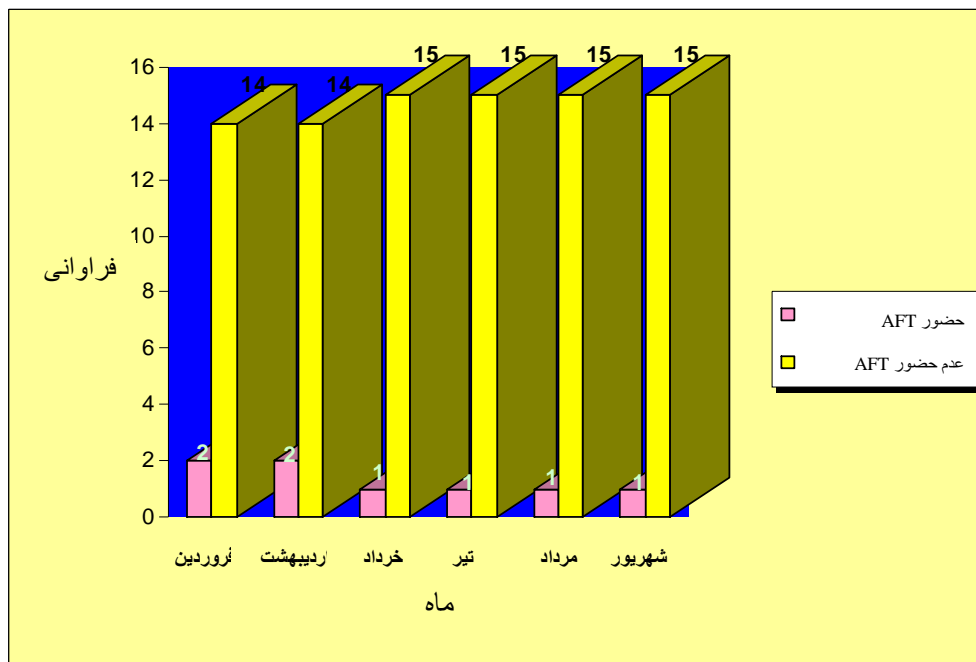
با توجه به $\text{sig}=0.46$ ، میزان شیوع آسپرژیلوس با فصل رابطه معنی داری از لحاظ آماری ندارد. نمودار ذیل (نمودار ۱-۲-۲-۳) میزان فراوانی آسپرژیلوس فلاووس را بر حسب فصل نشان می دهد.



نمودار ۱-۲-۲-۳: فراوانی آسپرژیلوس فلاووس بر حسب فصل

ب- به همین ترتیب جهت بررسی رابطه بین میزان شیوع عامل آسپرژیلوس فلاووس با ماه های برداشت نمونه ها، از آزمون خی دو یا کا- اسکویر مستقل استفاده شد.

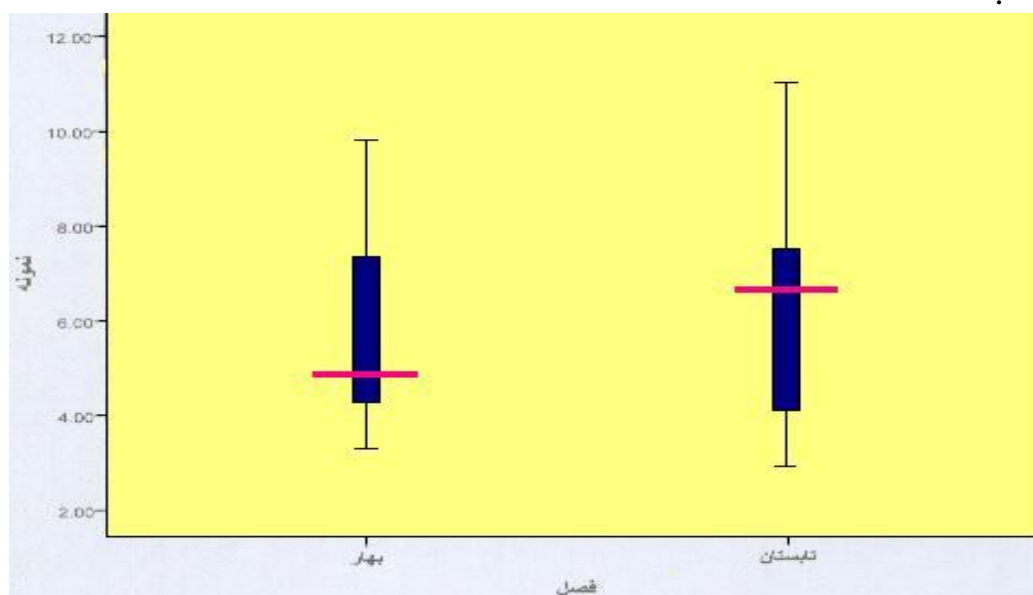
با توجه به $\text{sig}=0.955$ ، لذا میزان شیوع آسپرژیلوس با ماه های فصول نمونه گیری رابطه معنی داری از لحاظ آماری ندارد. نمودار ذیل (نمودار ۱-۲-۲-۳) میزان فراوانی آسپرژیلوس فلاووس را بر حسب ماه نشان می دهد.



نمودار ۱-۲-۲-۳: فراوانی آسپرژیلوس فلاووس بر حسب ماه

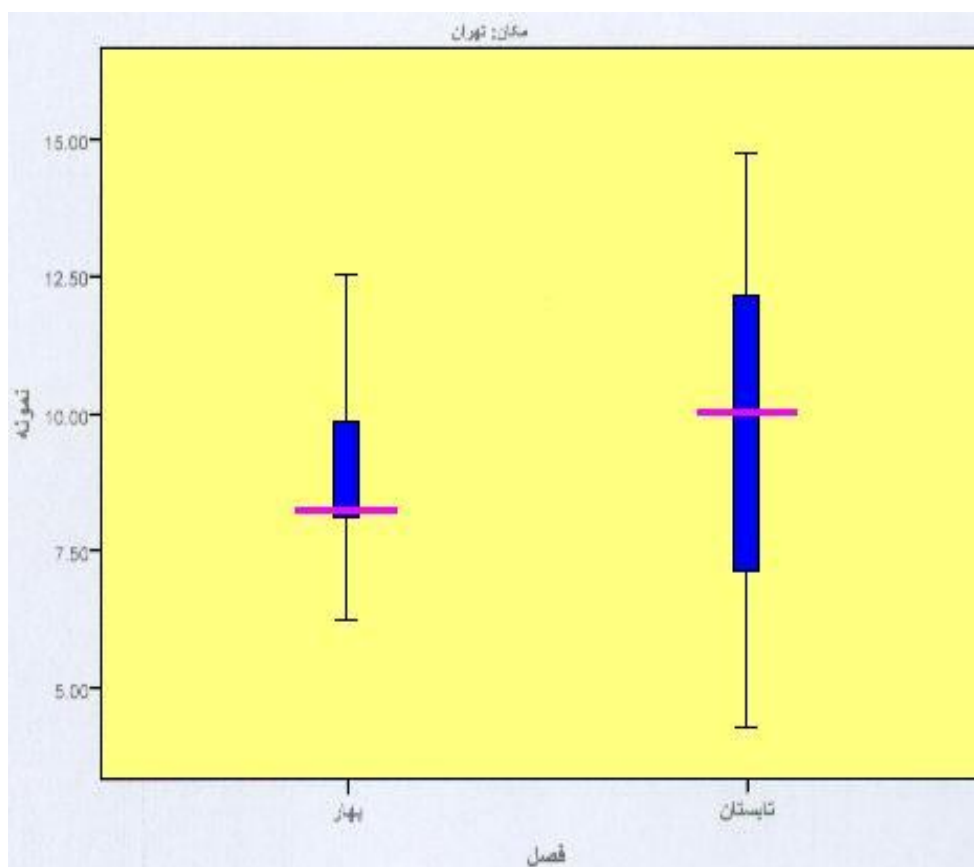
ج- در قدم بعدی جهت مقایسه باقیمانده آفلاتوکسین توتال در خوراک مصرفی انبار شده ماهیان مراکز مختلف پرورشی استان آذربایجان غربی بر حسب فصل از آزمون معنی داری تی استیودنت گروه های مستقل استفاده شده است.

با نگاهی به $\text{sig}=0.305$ جدول تی - تست گروه های مستقل (غیر وابسته) و رعایت شرط همگنی واریانس ها بر اساس مقدار F در آزمون لون با $\text{sig}=0.615$ ، نتیجه می گیریم میانگین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال در فصل بهار با تابستان یکسان بوده و تفاوت معنی داری در این راستا مشاهده نمی گردد. نمودار میله ای خطای (Error bar) ۲-۲-۲-۳ این نتیجه را به وضوح به تصویر کشیده است.



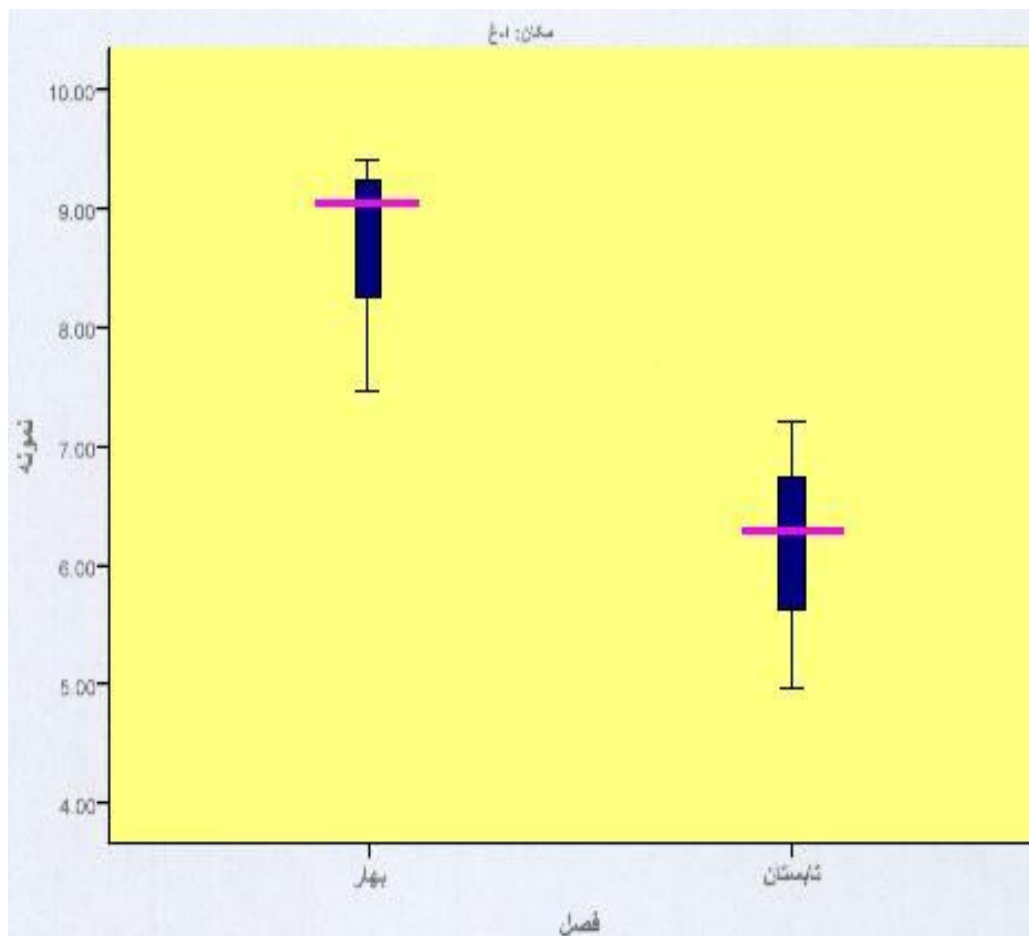
نمودار ۲-۲-۲-۳: نمودار میله ای خطای (Error bar) جهت مقایسه باقیمانده آفلاتوکسین توتال در خوراک مصرفی انبار شده ماهیان مراکز مختلف پرورشی استان آذربایجان غربی بر حسب فصل از آزمون معنی داری تی

د- جهت ارزیابی و مقایسه آفلاتوکسین توتال در خوراک تولیدی ماهیان سردآبی کارخانجات استان تهران بر حسب فصل از آزمون معنی داری تی - استیودنت گروه های مستقل استفاده شده است. $Sig.=0.785$ نشانگر عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال در فصل بهار با تابستان می باشد. یعنی اینکه وجود این عامل بر اساس فصل یکسان بوده و تغییری در این زمینه موجود نمی باشد. این نتیجه در نمودار میله ای خطای ۳-۲-۲-۳ به عینه نشان داده شده است.



نمودار ۳-۲-۲-۳ : نمودار میله ای خطای (Error bar) جهت مقایسه باقیمانده آفلاتوکسین توتال در خوراک تولیدی ماهیان سردآبی کارخانجات استان تهران بر حسب فصل از آزمون معنی داری تی

ه- جهت مقایسه میزان آفلاتوکسین توتال در خوراک تولیدی کارخانه تولیدی استان آذربایجان غربی به تفکیک فصل از آزمون معنی داری تی گروه های مستقل استفاده گردید. $Sig.=0.048$ مؤید این واقعیت است که بین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال کارخانه تولیدی خوراک آبزیان استان آذربایجان غربی در فصل بهار و تابستان تفاوت معنی داری در سطح کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری وجود دارد. به تعبیری دیگر میزان شیوع عامل آفلاتوکسین توتال در کارخانه استان آذربایجان غربی در فصل بهار بیشتر از فصل تابستان می باشد و می توان ادعا نمود که فصل در میزان شیوع عامل تأثیرگذار می باشد. گواه این ادعا نمودار میله ای خطای ۴-۲-۲-۳ می باشد.



نمودار ۳-۲-۴: نمودار میله ای خطای (Error bar) جهت مقایسه باقیمانده آفلاتوکسین توتال در خوراک تولیدی ماهیان سردابی کارخانه استان آذربایجان غربی بر حسب فصل از آزمون معنی داری تی

و- یافته های جانبی :

۱- مقایسه مقادیر آفلاتوکسین بر حسب مکان (استان های آذربایجان غربی و تهران) : جهت مقایسه میزان آفلاتوکسین در کارخانجات تولیدی خوراک آبزیان بر حسب مکان از آزمون تی تست گرو های مستقل استفاده شده است. با توجه به $sig.=0.048$ و عدم همگنی واریانس ها می توان شاهد وجود تفاوت در میزان شیوع این عامل در کارخانجات تولیدی به تفکیک مکان بود. (در سطح کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری). به تعبیر دیگر میزان شیوع این عامل در کارخانجات تهران (۹/۲ ppb) بیشتر از آذربایجان غربی (۷/۴ ppb) می باشد (نمودار ۳-۲-۱-۲۶).

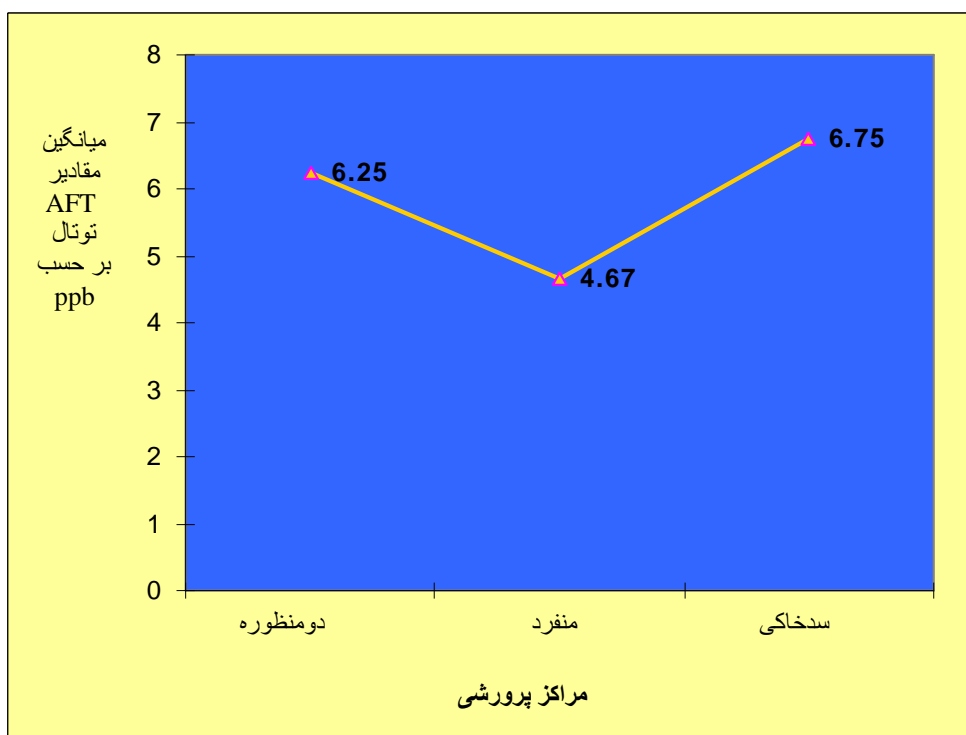
۲- مقایسه وجود عامل آفلاتوکسین در بین تمام کارخانجات مورد مطالعه (تهران و آذربایجان غربی)

جهت مقایسه میزان شیوع آفلاتوکسین توتال در بین تمام کارخانجات تولیدی خوراک ماهیان سردابی مورد مطالعه استان های تهران و آذربایجان غربی، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه مستقل استفاده شد.

Sig.=0.384 نشانگر عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین میزان شیوع عامل فوق در کارخانجات مورد مطالعه می باشد. به تعبیری دیگر میزان شیوع این عامل در تمامی کارخانجات مورد مطالعه یکسان می باشد.

۳- مقایسه میزان شیوع عامل آفلاتوکسین توتال بر اساس نوع مزارع : به منظور آزمون گزاره فوق الذکر، از تحلیل واریانس یک طرفه مستقل استفاده گردیده است.

Sig.=0.039 جدول آنوا نشان دهنده وجود تفاوت میزان شیوع عامل آفلاتوکسین توتال به تفکیک مزارع در سطح کمتر از ۰/۰۵ ($P<0.05$) از لحاظ آماری است. جهت مقایسه دو به دوی این تفاوت ها بر اساس شرط همگنی واریانس، با استفاده از آزمون لون و $\text{sig.}=0.104$ از تست تعقیبی LSD استفاده شده است. نتایج آزمون LSD نشان داده است که این تفاوت بین مزارع دومنظوره و منفرد در سطح کمتر از ۰/۰۵ و منفرد با سدخاکی در سطح کمتر از ۰/۰۵ می باشد. به بیانی دیگر میزان شیوع عامل در مزارع سدخاکی و دومنظوره بیشتر از منفرد می باشد. نمودار mean plot ذیل این نتیجه را نشان می دهد.



نمودار ۳-۲-۵ : نمودار مقایسه میزان فراوانی آفلاتوکسین توتال در مراکز مختلف پرورشی استان آذربایجان غربی

فصل چهارم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۱-۴: بحث و نتیجه گیری :

همان طور که در مقدمه اشاره شد، گرچه حدود ۴۰ سال است که مایکوتوکسین ها و عوارض ناشی از مصرف آن ها مورد بررسی محافل علمی و تحقیقاتی قرار گرفته است، ولی این مشکل ریشه در قرون وسطی دارد و به گواه تاریخ سابقه وجود این توکسین به ۶۰۰ سال قبل از میلاد مسیح باز می گردد. در منابع رقمی حدود ۲۰٪ از محصولات مختلف کشاورزی را که دستخوش حمله عوامل بیماریزا می شوند، نابود شده یا غیر قابل استفاده می دانند. بخش اعظمی از این خسران به قارچ ها بستگی دارد. برآورد میزان زیان وارده به محصولات از راه مایکوتوکسین ها، چندان عملی نمی باشد. ولی تسلسلی که از این ضایعات در زنجیره اقتصادی یک کشور به وجود می آید قابل پیگیری است. این ضایعات عبارتند از :

- ۱- کیفیت پایین محصولات توکسین دار و نیز قیمت ارزان تر آن ها،
- ۲- به کار گیری آن ها به عنوان کود یا سوخت به جای استفاده در غذای انسان و خوراک دام،
- ۳- ابتلای حیوان به عارضه مایکوتوکسیکوزیس در اثر تغذیه از خوراک دام آلوده و توکسین دار،
- ۴- اجبار تولیدکنندگان به صرف هزینه های اضافی بازدید، تجهیز آزمایشگاه های تجزیه مایکوتوکسین ها، تخصیص مخارج اضافی جهت نگهداری طولانی مدت یا پالودن محموله ها، خریداری ماشین آلات و تجهیز انبارها، کاربرد پاره ای از سموم قارچ کش، توکسین زدایی به منظور کاهش آلودگی های ناشی از مایکوتوکسین ها ،

۵- تهدید بازارهای فروش اعم از داخلی و خارجی. (کوشال و دیپاک ، ۱۳۸۳)

حدود ۲۰ سال پیش اگر در ایران صحبت از آفلاتوکسین و مرجوع نمودن محموله های آلوده می شد، آن را موضوعی سیاسی تلقی کرده و حل مشکل را در گرو بهبود روابط سیاسی با کشورهای طرف ادعا می دانستند. خیلی زود این واقعیت برای دولت مردان روشن شد که مسأله زهرابه های قارچی و آلودگی های توکسینی مواد غذایی هیچ گونه ارتباطی با روابط سیاسی ندارد، بلکه این اعتبار و اهمیتی است که دولت ها با توجه به جمعیت و نرخ غنا یا فقرشان، برای بهداشت آحاد جامعه قایل هستند. این موضوع بسیار مهم است که آن ها را به سوی وضع مقررات دقیق و سنگین برای قبول مواد غذایی عاری از آلودگی سوق داده است. مرجوع شدن محموله های پسته صادراتی ایران به اروپا که سابقه ای به قدمت کشف آفلاتوکسین یعنی حدود ۴۵ سال دارد، منجر به اقدامات جامع و گسترده ای به ویژه در دو دهه گذشته، در راستای بهداشتی کردن تولید و مکانیزه نمودن مراحل فراوری پسته از مبدأ تا مقصد صورت گیرد. برای حصول نتیجه یک بسیج همگانی نیاز بود که با همکاری سازمان های مختلف کشاورزی در نظام های مختلف باغبانی، حفظ نباتات و ترویج (در مراحل داشت، برداشت و انبارداری) میسر گردید. وزارت بهداشت، مؤسسه تحقیقات و استاندارد صنعتی ایران، گمرک و ارگان های دخیل در صادرات نیز در این زمینه فعالیت های چشم گیری داشتند. (کوشال و دیپاک ، ۱۳۸۳)

ذکر این مهم لازم است که در حال حاضر این مشکل فقط محدود به پسته و دیگر مغزیات درختی صادراتی و وارداتی نیست. بلکه طیف وسیعی از محصولات کشاورزی از جمله غلات که بخش مهمی از نیاز غذایی دام و افراد جامعه را به خود اختصاص داده است، را به دلیل پراکندگی بسیار وسیع عوامل توکسین ساز قارچی در طبیعت در برمی گیرد.

با نگاهی به ترکیب مواد غذایی مورد استفاده دام و ترکیب مواد خام مورد استفاده در خوراک تولیدی کارخانجات تولید خوراک دام، طیور و آبزیان، متوجه می شویم که بخش مهمی از ترکیبات مختلف به کار رفته را مواد غذایی تشکیل می دهد که بر اساس بررسی های انجام گرفته به راحتی می توانند در معرض آلودگی توسط عوامل توکسین قارچی قرار بگیرند.

در این بین ترکیب مواد خام تشکیل دهنده خوراک ماهیان سردابی (قزل آلا ی رنگین کمان) تولیدی کارخانجات تولید خوراک دام، طیور و ماهیان، که بسته به دوره رشد ماهی به صورت پلت (

pellet) های با اندازه های مختلف می باشد (شامل BFS, FFT₁, FFT₂, GFT₁, GFT₂, SFT, GFC) و در ذیل به آن ها اشاره شده است، مؤید این مهم است که این ماده غذایی نیز می تواند در معرض خطر آلودگی توسط عوامل قارچی توکسین ساز قرار گرفته یا مواد خام قبل از فراوری، دچار آلودگی شده و وارد زنجیره غذایی ماهی و مصرف کنندگان آن شود و این در شرایطی است که تحقیقات جامع و کاملی بر این فراورده غذایی مورد مصرف ماهیان تاکنون صورت نگرفته بود و همین امر منجر به انتخاب این موضوع و تحقیق در مورد آن در دو استان مهم تولیدکننده خوراک این ماهیان که از طرفی جایگاه مهمی از تولید ماهی پرورشی سردابی را در سطح کشور دارا هستند، گردید.

عمده این ترکیبات (بر اساس اعلام کارخانجات مربوط) عبارتند از : گندم، آرد گندم، گلوتن گندم، سبوس گندم، گلوتن ذرت، کنجاله تخم پنبه، کنجاله سویا، نشاسته، مخمر، پودر یونجه، پودر ماهی، سوپر پروتئین، پودر ضایعات کشتارگاه، روغن ماهی، روغن سویا، کنستانتره ماهی، پودر خون، ملاس، بایندر ژلاتینه، دی کلسیم فسفات، کربنات کلسیم، لستین، آنتی اکسیدان، نگهدارنده، رنگدانه، متیونین، لیزین هیدروکلراید، مکمل مینراله، ویتامین های E و C، ضدعفونی کننده های خوراک (نظیر Formycine® Gold Px) و جاذب های مایکوتوکسین (مثل MycosorbTM).

در این بین مواد غذایی غلات و مواد پروتئینی جیره دو گروه اصلی مواد خام ترکیبات هستند که در معرض آلودگی قرار دارند. بر اساس بررسی های به عمل آمده مواد نشاسته ای و غلات که از نظر فیزیکی دارای رطوبت کمتر می باشند نسبت به مواد پروتئینی، برای رشد قارچی کمتر مستعد بوده و در ظاهر ممکن است سالم تر به نظر آیند. (Jay, 1999). این در شرایطی است که محصول نهایی فراوری شده به صورت پلت هستند که به واسطه پایین بودن رطوبت آن ها (حدود ۹ %) کمتر مستعد به رشد قارچ مولد آفلاتوکسین می باشند. البته در شکل پودری مواد جاذب الرطوبه بوده و مستعد به آلودگی قارچی و متابولیت آنها می باشند (مواد خام مصرفی بیشتر در این حالت پودری به بازار عرضه می شوند و این زمینه آلودگی قبل از فراوری را در آن ها بیشتر به وجود می آورد.) (Quine, et al. 1994)

همانطور که در فصل سوم اشاره شد، در ۹۱/۷ درصد نمونه های مورد مطالعه آسپرژیلوس فلاووس مشاهده نگردیده است و فقط در ۸/۳ درصد نمونه ها این عامل مشاهده شده است.

این نتیجه می تواند مؤید این واقعیت باشد که با توجه به درصد بسیار کم عامل آسپرژیلوس فلاووس در نمونه های اخذ شده در خوراک ماهیان سردابی قزل آلا رنگین کمان پرورشی، تأثیر مستقیم این عامل بر حضور آفلاتوکسین های دتکت شده، بسیار کم رنگ بوده و تا حدی می توان آن را نادیده گرفت. به عبارتی دیگر می توان حضور آفلاتوکسین را مرتبط به حضور این ماده در مواد اولیه خام مورد استفاده جهت تولید خوراک مذکور، مرتبط دانست.

بر اساس موارد فوق الذکر، می توان حضور ۸/۳ درصدی آسپرژیلوس فلاووس به عنوان عامل مولد آفلاتوکسین در پلت های تولیدی را در موارد ذیل عنوان کرد:

- ۱- شکل فیزیکی محصول به صورت پلت که کمتر مستعد رشد قارچی هستند،
 - ۲- استفاده از مواد آنتی میکروبیال در ترکیب فراورده مانند Formycine® Gold Px با ترکیب اصلی فرمالدئید، اسیدپروپیونیک، بنتونایت سدیم و آمونیاک که طیف اثر آن را بر روی باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها ایجاد کرده است و باعث کاهش رشد عوامل قارچی شده است.
- همان طور که در جدول ۱-۲-۲-۳ و ۲-۲-۲-۳ نشان داده شده است، میزان شیوع آسپرژیلوس با فصل و ماه رابطه معنی داری از لحاظ آماری ندارد. همچنین با توجه به یافته های جدول تقاطعی نیز متوجه می شویم که وجود یا عدم وجود عامل به تفکیک فصل و ماه یکسان بوده و این نیز خود گواه ادعای فوق الذکر می باشد. و از طرفی شیوع آسپرژیلوس به تفکیک فصل و ماه (در هر فصل و ماه)

بسیار ناچیز می باشد. به گونه ای که می توان اثر آن را در تولید آفلاتوکسین موجود در نمونه های خوراک ماهیان برداشت شده، نادیده گرفت. این یافته خود تأیید کننده مبحث فوق الاشاره می باشد. در منابع عنوان شده است که درصد بروز آلودگی به *آسپرژیلوس فلاووس* تحت تأثیر فصول سال و موقعیت مکانی قرار دارد. اگر چه موقعیت مکانی خود به تنهایی دارای تأثیر کمتری است. نم زیاد و رطوبت نسبی بالا برای جوانه زنی اسپورها و تکثیر قارچ ضروری است. از طرفی بوته های غلاتی که در معرض تنش خشکی قرار گرفته باشند، بیش از دیگر بوته ها نسبت به آلودگی با *آسپرژیلوس فلاووس* حساس و آسیب پذیر می شوند. (ND Davis, 1986) چنین شرایط مطلوب جهت رشد را بیشتر در دو فصل بهار و تابستان مشاهده می کنیم و در فصول سرد با وجود رطوبت نسبی بالا، به دلیل درجه حرارت پایین امکان رشد میکروارگانیسم و جوانه زنی کنیدی ها را کمتر مشاهده می کنیم. علی ایحال میزان رشد *آسپرژیلوس* در خوراک ماهیان سردابی در هر دو استان آذربایجان غربی و تهران، بر اساس آنالیز های اماراتی صورت گرفته ارتباط معنی داری با فصول نداشته و میزان شیوع در هر دو فصل بهار و تابستان (فصول نمونه گیری) تقریباً یکسان و در کل برابر ۸/۳ درصد می باشد.

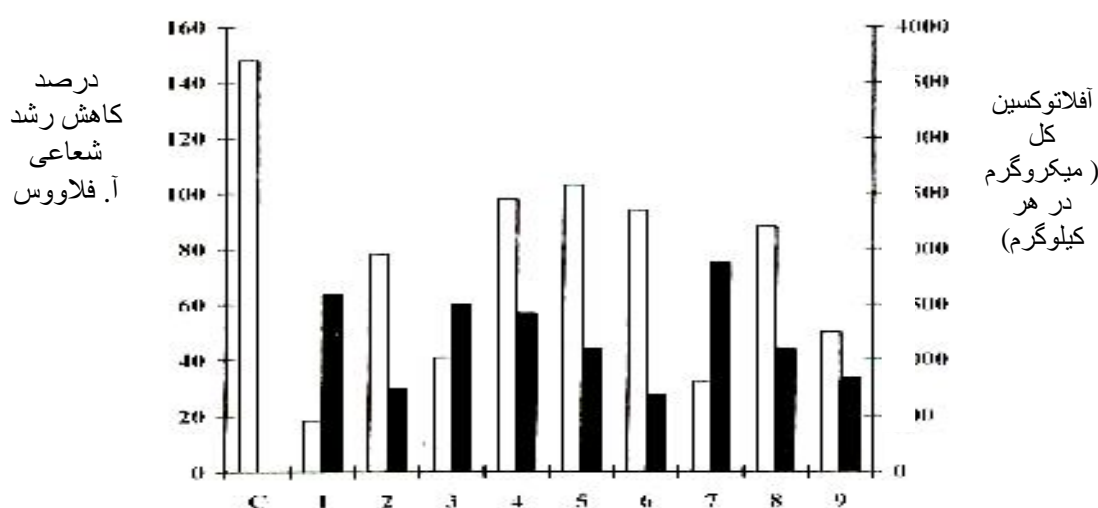
ارزیابی ها و آنالیز داده های به دست آمده از میزان آفلاتوکسین جداسازی شده از خوراک ماهیان قزل الای رنگین کمان تولیدی و انبار شده در استان های تهران و آذربایجان غربی بر اساس سؤالات مطرح شده تحقیق حاضر (در فصل سوم)، موارد ذیل را نشان داده است:

۱-۱-۴: بر اساس آزمون تی تک گروهی یافته های حاصل از مقادیر آفلاتوکسین توتال به تفکیک نوع مزارع، کارخانجات، فصل و ماه های سال در مطالعه حاضر در قالب نمونه های ۱ و ۲، بر اساس خروجی های spss، همگی پایین تر از سطوح تolerانس مشخص شده توسط کمیته مشترک FAO و WHO که در جدول شماره ۱-۳-۱ و ۳-۳-۱ بخش سوم فصل یک آمده است، می باشد. (میانگین میزان آفلاتوکسین توتال در تمامی یافته ها از ۱۱ ppb کمتر است) و لذا می توان خوراک های تولیدی کارخانجات این دو استان و آنچه که در آن دوره زمانی (بهار و تابستان ۸۶) مورد مصرف پرورش دهندگان ماهیان سردابی بوده است، را بر اساس این یافته سالم معرفی نمود.

بی شک یکی از عمده مسایل تأثیرگذار در این سلامت، عدم حضور و رشد قارچ های آفلاتوکسین ساز در خوراک های نمونه برداری شده بوده است که در مباحث ماقبل مذکور به آن پرداخته شد. از طرفی حضور دیگر عوامل قارچی جداسازی شده، خود شاید مانعی در مقابل رشد و تولید آفلاتوکسین در این فراورده ها بوده باشد. بر اساس نتایج اعلام شده در جدول شماره ۱-۳-۱ جنس های دیگری از کپک ها شامل *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آ. نیجر*، *رایزوپوس*، *تریکوتسیوم* و *فوزاریوم* نیز در تعدادی از نمونه ها یافت شده است که درصد حضور آنها در نمودارهای شماره ۲-۱-۲-۳ تا ۶-۱-۲-۳ اشاره شده است. این در شرایطی است که بر اساس مطالعات انجام شده توسط Horn و Choudhary به ترتیب به سال های ۱۹۸۳ و ۱۹۹۲ فلور قارچی هم زیستگاه با *آسپرژیلوس فلاووس* در دانه های ذرت به لحاظ تأثیرشان بر بیوسنتز آفلاتوکسین، مورد بررسی قرار گرفته و نتایج جالبی حاصل آمده است. تمامی ۱۳ نوع ارتباط گونه های قارچی مرتبط با *A. flavus*، از تولید آفلاتوکسین B_1 و G_1 به میزانی متغیر (از ۳۴/۳ % تا ۱۰۰ %) ممانعت به عمل می آوردند. توانایی جلوگیری از رشد شعاعی *آ. فلاووس* توسط قارچ های *فوزاریوم* و *رایزوپوس* در تحقیق Choudhary که به ترتیب تا میزان ۵۹/۸ و ۴۲ درصد مشاهده شد، مستقیماً موجب مهار درصدی تولید آفلاتوکسین می گشت. در مطالعات Horn نرخ کنترل رشد شعاعی *آ. فلاووس* توسط قارچ های *آ. نیجر* و *فوزاریوم* به ترتیب ۶۳ و ۳۰ درصد و کاهش درصدی تولید آفلاتوکسین به ترتیب ۸۸/۶ و ۵۲/۳ درصد اندازه گیری شده است (Horn, 1983 & Choudhary, 1992). نمودار شماره ۴-۱ ذیل تأثیر تعدادی از فلور قارچی هم زیستگاه بر رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *آ. فلاووس* را به وضوح نشان می دهد.

به احتمال چنین تأثیری بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین در مواد خام اولیه مصرفی و فراورده نهایی نیز وجود داشته باشد که نباید از آن غافل شد و نیاز به تحقیقات بیشتری در این خصوص احساس می شود. در این راستا می توان چنین عنوان کرد که دلیل کاهش میزان آفلاتوکسین می تواند یک یا ترکیبی از عوامل ذیل باشد:

- ۱- رقابت فیزیکی بر سر مکان رشد و نمو یا عناصر مغذی،
- ۲- رقابت قارچ مورد آزمایش با *A. flavus* بر سر سوبسترای که جهت تولید آفلاتوکسین مورد نیاز *آسپرژیلوس فلاووس* است،
- ۳- تغییر ایجاد شده در زیست محیط بیوشیمیایی مؤثر بر چرخه های متابولیکی به دلیل حضور قارچ مورد آزمایش،
- ۴- تجزیه یا توکسین زدایی آفلاتوکسین تولید شده. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)



- | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 1- <i>A. niger</i> | 2- <i>Fusarium oxysporum</i> | 3- <i>F. moniliforme</i> |
| 4- <i>Penicillium chrysogenum</i> | 5- <i>Alternaria tenuis</i> | 6- <i>A. candidus</i> |
| 7- <i>Trichoderma viride</i> | 8- <i>Rhizopus nigricans</i> | 9- <i>Cladosporium herbarum</i> |
| ■ رشد شعاعی | □ آفلاتوکسین | =C شاهد |

نمودار ۱-۴: تأثیر فلور قارچی گوناگون هم زیستگاه بر رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *A. flavus* (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

از جمله عوامل دیگر قابل بحث این است که با توجه به درصد بسیار پایین حضور قارچ توکسین زا در محصول، اثر آن را در تولید آفلاتوکسین در پلت ها می توان کم اهمیت خواند. لذا می توان ادعا نمود که بخش اعظم آفلاتوکسین (با وجود اینکه مقدار آن از حد مورد پذیرش آفلاتوکسین نیز پایین تر است)، در خود مواد خام مصرفی، قبل از فراوری وجود داشته است و احتمال استفاده از محصولات آلوده به توکسین با توجه به نوع ترکیبات مورد استفاده در تهیه خوراک ماهیان وجود دارد. در طی بررسی های به عمل آمده توسط آقای توتونچیان در فاصله سال های ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۱ در استان های آذربایجان غربی و شرقی، ضمن اشاره به افزایش و سیر صعودی (۴ برابر افزایش) ارسال نمونه های غذایی مورد استفاده دام و طیور به آزمایشگاه های کنترل کیفیت در دو استان که نشان از توجه بیشتر تولیدکنندگان و دامداران به این مهم است، اشاره شده است که بیشترین میزان آلودگی در مورد ترکیبات پروتئینی نظیر پودر گوشت، پودر ماهی و کنسنتانتره دیده شده است و در این بین آلودگی دیگر ترکیبات همچون ملاس، تقاله چغندر، کنجاله تخم پنبه، سویا و ذرت نیز دیده شده است که دامنه ای مابین ۱۰ تا ۳۵ را دربرگرفته است. (توتونچیان، ۱۳۸۱)

با توجه به اینکه بخش زیادی از مواد خام مصرفی که قبلاً به آن ها اشاره شد، از مواد تولیدی در خود استان و استان های مجاور است ، می توان مدعی بود که به دلیل شرایط نامساعد تهیه و ذخیره این مواد خام که اکثراً به واسطه غنی بودن از پروتئین و رطوبت بالا مستعد درگیری با آسپرزیلوس ها هستند، به راحتی آلودگی به خوراک نهایی ماهیان منتقل می شود.

در این راستا عملیاتی که بر مواد خام مورد استفاده در کارخانجات تولیدی انجام می شود نظیر پاک کردن و جداسازی، آسیاب کردن خشک و مرطوب، استفاده از مواد آنتی میکروبیال و جاذب های مایکوتوکسین خود می تواند بر کاهش بار آلودگی قارچی و کاهش درصد کل آفلاتوکسین توتال موجود در محصول نهایی مؤثر باشد.

در منابع مختلف به این مهم اشاره شده است که جداسازی و تمیز کردن یکی از منابع اولیه حذف خطر آلودگی مایکوتوکسینی در مواد غذایی به خصوص ذرت، بادام زمینی و سیب است. در مطالعه ای توسط کول در سال ۱۹۸۹ مشخص شده که شناور سازی و استفاده از چگالی در جداسازی دانه های ذرت آلوده در کاهش غلظت آفلاتوکسین سهم به سزایی داشته است. (RJ Cole, 1989) همچنین بر پایه گزارش فیلیپس و همکارانش در سال ۱۹۹۴ روش شناور سازی، میزان متوسط آفلاتوکسین را از ۳۰۱ ppb به ۲۰ ppb کاهش داده است (TD Phillips, 1994) جدا کردن بخش های پوسیده و آلوده ای که با چشم غیر مسلح دیده می شوند، خود تأثیر بسیار زیادی بر کاهش آلودگی دارد.

مطالعات بنیت و همکارانش در سال ۱۹۷۸، همچنین بررسی های وود و همکارانش در سال ۱۹۷۲ نشان داده اند که طی آسیاب کردن مرطوب ذرت، آفلاتوکسین B_1 در اجزای آسیاب شده توزیع می گردد. بدین معنی که آفلاتوکسین به ترتیب در آب شستشو (۳۹ تا ۴۲ %) و الیاف (۳۰ تا ۳۸ %)، و باقیمانده اش در گلوتن (۱۳ تا ۱۷ %)، گیاهک (۶ تا ۱۰ %) و نشاسته (فقط ۱ %) توزیع شدند (Bennett et al., 1978 & Wood et al., 1982)

در تحقیقی توسط اسکات در سال ۱۹۸۴ نشان داده شد که در آسیاب کردن خشک ذرتی که به طور طبیعی آلوده شده بود بالاترین میزان آفلاتوکسین B_1 در اجزای گیاهک و پوست دانه تشکیل گردید و البته توزیع توکسین بسته به سطوح آلودگی متغیر بود. بلغور، آرد و کنجاله کم چربی ذرت تنها حاوی ۶ تا ۱۰ % آفلاتوکسین B_1 بودند. عمل آوری اولیه در مورد گندم آلوده به آفلاتوکسین B_1 میزان آن را تا ۴۷ % در آرد گندم کاهش داده و حداکثر میزان این توکسین در سبوس آن دیده شده است. (Scott, 1984)

۴-۱-۲: با نگاهی به $\text{sig}=0.305$ ($P>0.05$) جدول تی-تست گرو های مستقل (غیر وابسته) و رعایت شرط همگنی واریانس ها بر اساس مقدار F در آزمون لون با $\text{sig}=0.615$ در بخش ج تحلیل استنباطی داده ها در فصل سوم، نتیجه می گیریم میانگین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال در فصول بهار با تابستان در انبار های خوراک مراکز مختلف پرورشی ماهیان سردابی یکسان بوده و تفاوت معنی داری در این راستا نیز مشاهده نمی گردد. به عبارتی دیگر فصل به عنوان عامل اصلی تأثیر گذار در تولید و افزایش مقدار آفلاتوکسین در انبار های خوراک ماهیان سردابی استان آذربایجان غربی نقشی نداشته است. با توجه به اینکه بر اساس منابع، فصل و پارامترهای دما و رطوبت به عنوان عوامل اصلی تأثیر گذار بر میزان تولید آفلاتوکسین تلقی شده است، ولی دلیل این یکسان بودن عامل در انبارها، شاید به تنوع محصولات خام مورد استفاده در تهیه این خوراک در کارخانجات و همچنین تنوع سفارشات از شرکت های مختلف تولید خوراک ماهیان در استان های مختلف باشد. به عبارتی همه مراکز پرورشی استان از یک کارخانه سفارش خوراک نمی دهند و گاه عدم کیفیت مقطعی در تولید کارخانه ای، و با توجه به این مسئله که همیشه امکان سفارش محصول قبل از اتمام خوراک در انبارها وجود دارد و نیاز به انبارداری طولانی مدت نمی باشد (به استناد نظر صاحبان و مدیران مراکز پرورشی)، آن ها به خرید و سفارش محصول از کارخانه ای دیگر وا می دارد. این در شرایطی است

که نوع مواد خام کارخانجات تولیدکننده با توجه به موقعیت مکانی و شرایط اقلیمی متفاوت کارخانه، و گاه تفاوت در فرمولاسیون محصول، متفاوت از همدیگر است. این تفاوت به طور قطع، در میزان آلودگی به عوامل توکسیژنیک قارچی و همچنین مقدار مایکوتوکسین های موجود در ماده غذایی هم می باشد که از آن دسته می توان به آفلاتوکسین ها اشاره کرد. با توجه به موارد فوق الذکر و عدم یکسان بودن مواد خام مصرفی و تنوع در محصول، عدم ارتباط معنی دار بین مقدار آفلاتوکسین در خوراک متنوع مراکز پرورشی و فصل یا ماه قابل توجیه باشد.

۴-۱-۳: Sig.= 0.785 ($P>0.05$) جدول تی بند د تحلیل استنباطی فصل سوم، نشانگر عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال در فصل بهار با تابستان در خوراک تولیدی کارخانجات استان تهران می باشد. یعنی اینکه وجود این عامل بر اساس فصل یکسان بوده و تغییری در این زمینه موجود نمی باشد. در این مورد نیز به احتمال، تنوع مواد خام مصرفی و تفاوت در انبارداری مواد غذایی عامل این یکسان بودن توکسین خوراک های تولیدی در فصول مختلف باشد.

۴-۱-۴: Sig.= 0.048 ($P<0.05$) جدول تی بند د تحلیل استنباطی فصل سوم، مؤید این واقعیت است که بین میزان باقیمانده آفلاتوکسین توتال کارخانه تولیدی خوراک آذربایجان غربی در فصل بهار و تابستان تفاوت معنی داری در سطح کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری وجود دارد. به تعبیری دیگر میزان شیوع عامل آفلاتوکسین توتال در کارخانه استان آذربایجان غربی در فصل بهار بیشتر از فصل تابستان می باشد و می توان ادعا نمود که فصل در میزان شیوع عامل تأثیرگذار بوده است. دلیل تفاوت در این ارتباط در کارخانه خوراک آذربایجان غربی با کارخانجات تهران را می توان در این دانست که این تک کارخانه در طول دوره تولید خود از منابع یکسانی استفاده نموده اند که این منابع نیز به تبع فصل از نظر بار آلودگی قارچی و حضور آفلاتوکسین، دچار تغییرات شده است. وجود دما و رطوبت مناسب در فصل بهار در منطقه از طرفی، و از طرف دیگر با توجه به اینکه بیشتر ترکیبات غذایی مستعد آلودگی من جمله ترکیبات پروتئینی (پودر گوشت، پودر خون، پودر ضایعات کشتارگاه، بخش زیادی از غلات و مواد نشاسته ای) از خود استان تأمین می شود، می تواند معنی داری ارتباط بین فصل را با میزان حضور آفلاتوکسین، توجیه کند.

۴-۱-۵: با توجه به sig.=0.048 ($P<0.05$) و عدم همگنی واریانس ها در بند ۱ یافته های جانبی فصل سوم، می توان شاهد وجود تفاوت در میزان شیوع آفلاتوکسین در کارخانجات تولیدی به تفکیک مکان بود. (در سطح کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری). به تعبیر دیگر میزان شیوع این عامل در کارخانجات تهران (۹/۲) بیشتر از آذربایجان غربی (۷/۴) می باشد. علت این موضوع که مباحث فوق اشاره نیز به آن پرداخته شد، تأثیر مکان و اقلیم بر تولید آفلاتوکسین می باشد. موقعیت مکانی و اقلیمی هر منطقه در خصوص پارامترهای مهمی چون میزان رطوبت، دما، وزش بادهای موسمی، آفت حشرات، نوع فرهنگ و نحوه مدیریت محصول قبل و پس از برداشت محصول، آسیب های وارده بر سطح محصول، نحوه انبارداری و وضعیت انبارهای مورد استفاده برای این امر، همه و همه تأثیر گذار است. هر کدام از پارامترهای عنوان شده همچنانکه در مباحث قبلی به آن اشاره شد بر میزان حضور آفلاتوکسین می تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم مؤثر باشد. بدین ترتیب بالا بودن بار آلودگی به آفلاتوکسین توتال در کارخانجات استان تهران نسبت به استان آذربایجان غربی و معنی دار بودن ارتباط بین میزان آفلاتوکسین موجود با مکان، شاید منتج از فرایندهایی باشد که به آن ها اشاره شد.

۴-۱-۶: Sig.= 0.039 جدول آنوا (ANOVA) بند ۳-و (یافته های جانبی) فصل سوم، نشان دهنده وجود تفاوت میزان شیوع عامل آفلاتوکسین توتال به تفکیک مزارع در سطح کمتر از ۰/۰۵ ($P<0.05$) از لحاظ آماری است. جهت مقایسه دو به دوی این تفاوت ها بر اساس شرط همگنی واریانس، با استفاده از آزمون لون و sig.= 0.104 از تست تعقیبی LSD استفاده شده است. نتایج آزمون LSD نشان داده است که این تفاوت بین مزارع دوماظوره و منفرد در سطح کمتر از ۰/۰۵ و

منفرد با سدخاکی در سطح کمتر از ۰/۰۵ می باشد. به بیانی دیگر میزان شیوع عامل در مزارع سدخاکی و دومنظوره بیشتر از منفرد می باشد. این تفاوت مابین مراکز پرورشی، با در نظر گرفتن حضور بسیار ناچیز آسپرژیلوس در خوراک ها، صرفاً مربوط به شرایط انبار داری نمی تواند باشد. چرا که بر اساس ارزیابی های به عمل آمده وضعیت بسیاری از مراکز صرف نظر از نوع آن، بسیار نزدیک به هم و بدون هیچ نوع کنترل بر پارامترهای اصلی دما و رطوبت، اعمال تهویه مناسب و جریان هوای تحت کنترل، استفاده از پالت و سکوهای طبقه بندی و ایزولاسیون مناسب، ضد عفونی کردن محیط انبار و ... بودند و صرفاً بخشی از محل را که گاه به عنوان گاراژ و انبار عمومی، و گاه بخشی از منزل مسکونی و در پاره ای از موارد انبار های مستقل بدون رعایت نکات استاندارد انبارداری، استفاده می کردند. در اشکال ذیل وضعیت تعدادی از انبارها به تصویر کشیده شده است.



شکل ۴-۱: وضعیت تعدادی از انبارهای مراکز پرورشی (دومنظوره، سدخاکی و منفرد) در استان آذربایجان غربی (تصاویر از نگارنده)





ادامه شکل ۴-۱

بدین سان می توان عمده عامل تأثیر گذار را بهره برداری استخر های منفرد از محصولات کارخانه های متفاوت در طول دوره نمونه برداری بهار و تابستان ذکر کرد که تفاوت در میزان آفلاتوکسین خوراک مورد استفاده، عامل اصلی این اختلاف معنی دار بین مزارع سد خاکی و دامنظوره با منفرد بوده است.

ب- پیشنهادات :

با وجود آنکه مقدار حضور آسپرژیلوس توکسین زا و آفلاتوکسین تولیدی آن ها در خوراک تولیدی و مورد استفاده در دو استان تهران و آذربایجان غربی بر اساس تحقیق حاضر، بر اساس دستورالعمل ها و مقررات ملی و جهانی (اعلامی از طرف FAO و WHO) سالم تشخیص داده شده است، علی ایحال برای کاهش هر چه بیشتر این عامل مشکل آفرین در رنجیره غذایی مصرف کنندگان، راه کارهایی در قالب پیشنهادات ذیل ارائه می شود. چراکه نباید حضور مقادیر کم این قارچ را که به محض حصول شرایط رشد، بسیار سریع رشد می باشد . بالقوه خطر ساز است، نادیده گرفت.

بر اساس گزارشات سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (FAO) تولید محصولات کشاورزی به سختی می تواند پاسخگوی نیاز جمعیت رو به رشد جهان باشد و این در حالیست که هر ساله حداقل ۲۵٪ محصولات غذایی در جهان با میکوتوکسین ها آلوده می شوند (سایت اینترنتی فائو) بنابراین نابودکردن این محصولات یا تبدیل آن ها برای مصارف غیر خوراک دام و انسان معمولاً عملی نیست. در این بین مدیریت ریسک از طریق فرآوری و سم زدایی و به منظور جلوگیری از خطرات واقعی ناشی از آلودگی به میکوتوکسین ها و حفظ ذخیره غذایی جهان، تبدیل به یک موضوع اصلی بحث در امنیت غذایی شده است. برنامه تلفیقی امنیت غذایی در کشور می بایست دربرگیرنده موارد ذیل باشد:

۱- اهمیت آلوده کننده ها از نظر اثرگذاری بر بهداشت عمومی؛

۲- عوامل مؤثر بر فراهم بودن منابع غذایی کشورها؛

۳- اقتصاد؛

۴- زیرساختارهای قانونی؛

۵- منابع تحلیلی؛

۶- آموزش تولیدکننده و مصرف کننده؛

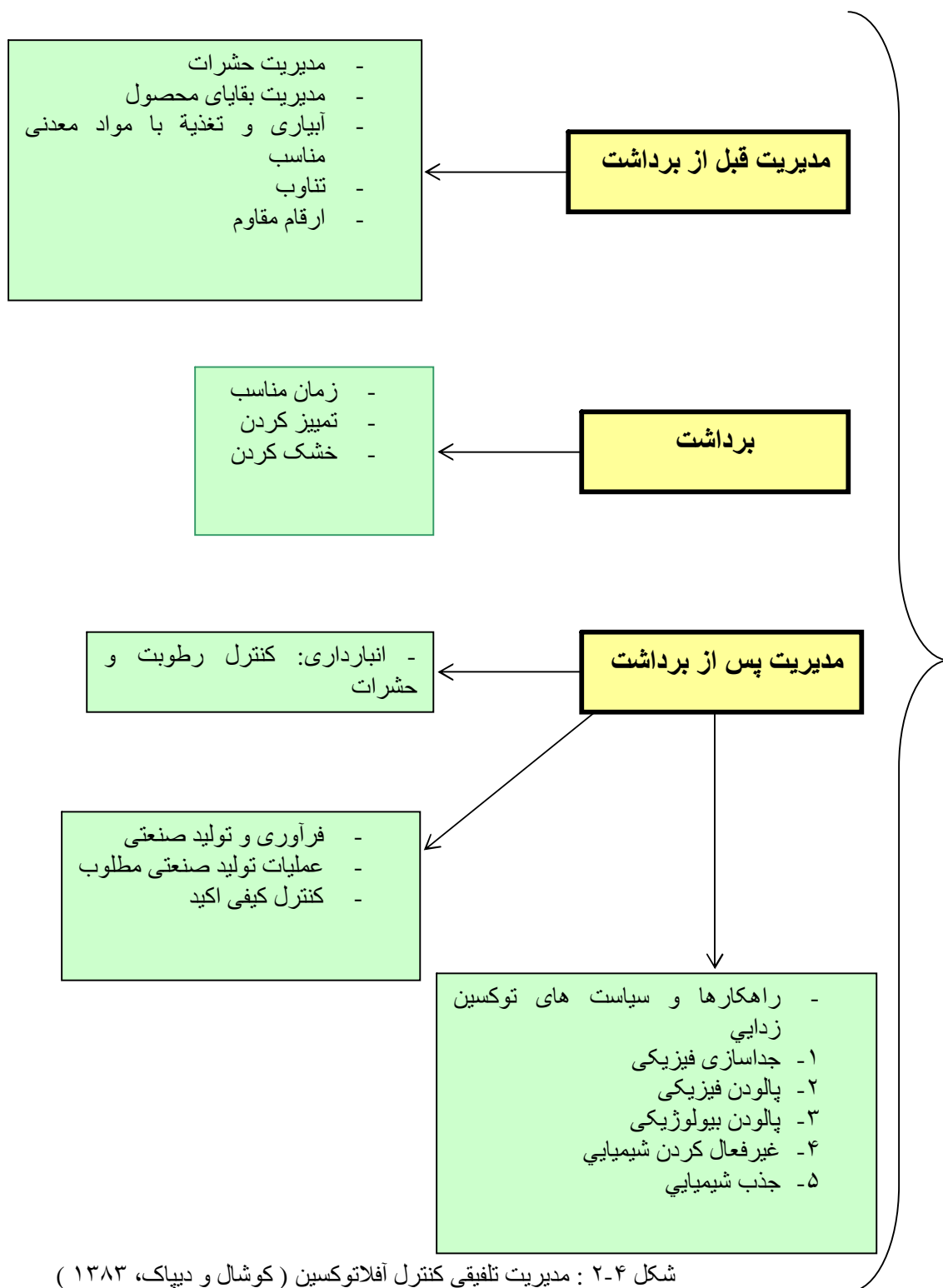
۷- تأثیر مطلوب سیستم های ارتباطی؛

۸- قابل دسترس بودن فن آوری پیش و پس از برداشت و همزمان با برداشت. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

در این میان، پیشگیری از بروز آلودگی از طریق مدیریت پیش از برداشت، بهترین روش کنترل آلودگی به آفاتوکسین هاست. با این وجود در صورت بروز آلودگی چنانچه محصول برای مصارف خوراکی و علوفه ای استفاده شود، زیان های همراه توکسین ها می بایست از طریق فرآیندهای پس از برداشت، کنترل و مدیریت شود. ولی به طور ایده آل وجود یک سیستم مدیریت تلفیقی توصیه می شود. شکل ۲-۴ شمایی است که جنبه های منتخب یک برنامه کنترل تلفیقی آفاتوکسین را نشان می دهد. این برنامه قادر است به عنوان یک سیستم شناخته شده در معرفی راهکارهای سلامت غذایی مواد غذایی و از جمله خوراک تولیدی ماهیان سردابی مورد استفاده قرار گیرد. بهتر است به منظور عمل فرآوری خوراک ماهیان سردابی (قرل الای رنگین کمان) به سیستم های مدیریت خطر سنجی نقاط بحرانی (Hazard Analysis Critical Control Point/ HACCP) توجهی خاص مبذول شود. پارامترهای کنترل می تواند شامل کنترل زمان برداشت، حرارت و رطوبت در جریان مراحل ذخیره سازی و حمل و نقل، انتخاب محصولات خام مورد استفاده جهت خوراک و اطمینان از وضعیت سلامت آن، شرایط پالودن، توکسین زدایی، حرارت، افزودن مواد شیمیایی و انبار کردن محصول نهایی و حمل و نقل صحیح باشند.

بی شک در خصوص خوراک تولیدی ماهیان سردابی در کارخانجات که محصولی فرآوری شده و ترکیبی از مواد غذایی که گاه خود تحت فرآیند های مختلف فیزیکی و شیمیایی از حالت خام اولیه به شکل پودر یا با ویسکوزیته بالا در می آیند، و گاه به صورت ترکیبی با دیگر افزودنی ها و مواد دیگر به بازار عرضه می شوند، بحث مدیریت پیش از برداشت و برداشت در مزرعه یا در مورد فراورده های دامی، قابل طرح و پیگیری نیست. قطعاً در این بخش تولیدکنندگان اصلی و اولیه مواد خام مصرفی یعنی کشاورزان و دامپروران و دامداران، با اتخاذ تدابیر و روش های علمی توصیه شده باید در ایجاد محصولی با کمترین بار آلودگی آفاتوکسینی اهتمام ورزند. نظارت و مونیتورینگ سازمان ها و ارگان های کنترل کننده همچون وزارت جهاد کشاورزی، سازمان دامپزشکی کل کشور، مؤسسه استاندارد و وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و دیگر ارگان های مرتبط می توانند با ارائه برنامه های کاربردی و عملیاتی نمودن آن، همانند آنچه در مورد پسته با تشکیل یک بسیج عمومی صورت گرفت، بسیار تأثیرگذار باشند. آموزش تولیدکنندگان داخلی در خصوص توجه به مسئله مهم توکسین قارچی و اثرات منفی آن ها بر سلامت مصرف کنندگان، و به کار بستن آخرین متدهای توصیه شده در کاهش این عامل شامل به کاربردن بذر اصلاح شده و مقاوم در برابر قارچ زدگی، آبیاری مناسب و جلوگیری از ایجاد تنش خشکی بر محصول، مدیریت حشرات و مبارزه اصولی با حشرات آفت که به عنوان عاملی بسیار مؤثر بر لانه گزینی، رشد و تکثیر قارچ ها در محصولات زراعی مطرح می باشند، مدیریت بر بقایای محصول می باشد، ضروری و واجب است. شکل ذیل (۳-۴) می تواند به عنوان الگوی ارزیابی ریسک و برنامه امنیت غذایی را در مورد محصولات تولید داخل پیش روی مسئولین و ارگان های نظارتی قرار دهد. در مورد مواد مورد نیاز وارداتی نظارت مستمر و انجام آزمایشات کیفی با اعمال نمونه برداری صحیح باید دستور کار قرار گیرد و نسبت به انجام آن با جدیت فراوان اعمال اثر شود.

رعایت نکات ایمنی و بهداشتی در انبار مواد غذایی خام مورد مصرف جهت تولید خوراک ماهیان سردابی، می تواند نقش بسیار مؤثری در کاهش آلودگی به اسپرزیلوس ها و آفاتوکسین ها خواهد داشت. بسیاری از محصولات زراعی انباری و فراورده های آن ها، میوه ها، انواع پنیر و فراورده های گوشتی و فراورده های مختلف پروتئینی نظیر پودر گوشت، پودر ماهی، پودر ضایعات



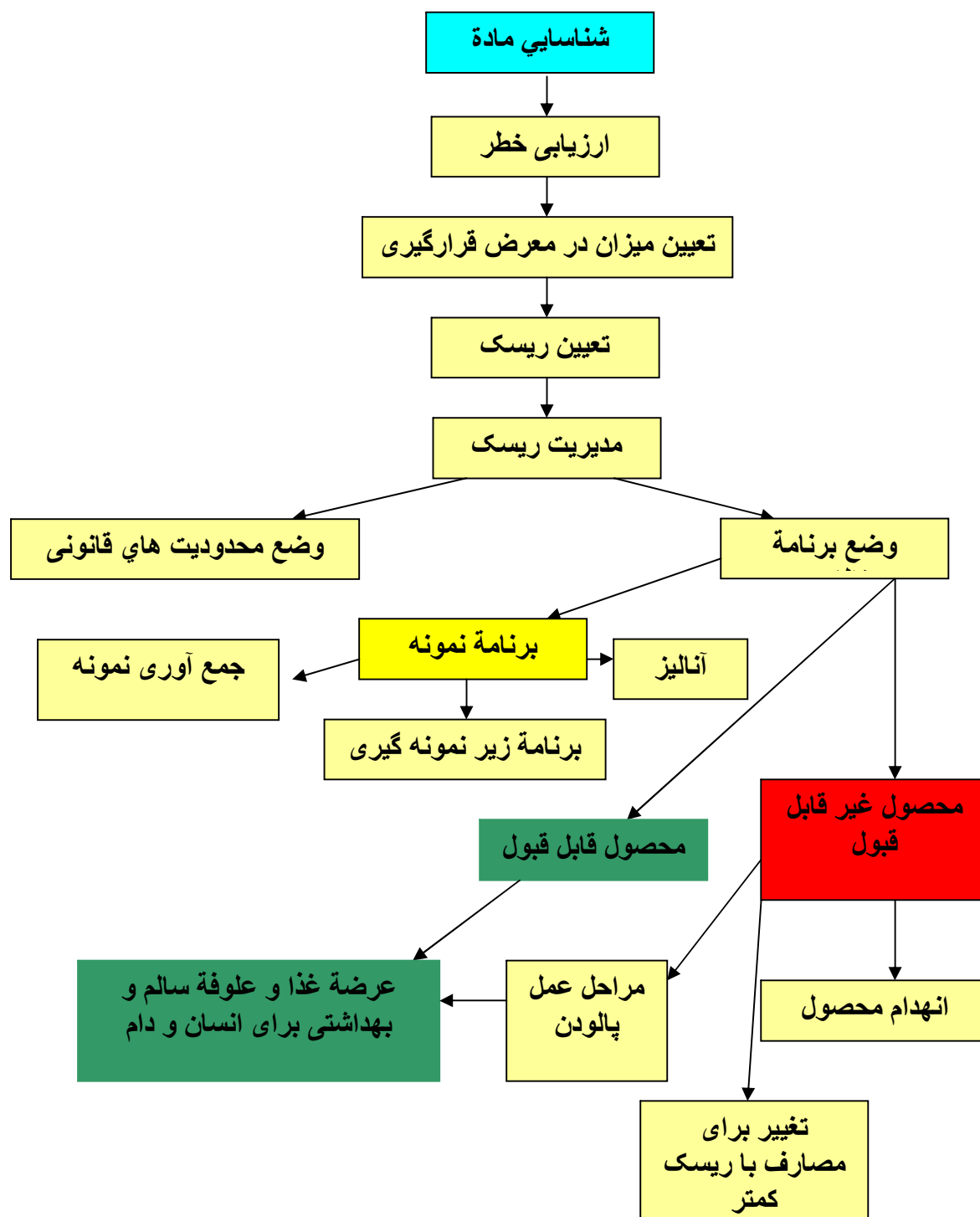
کشتارگاهی، سوپر پروتئین ها، مکمل های پروتئینی و ویتامینه و ... سوبستراهای بسیار مناسبی برای قارچ های توکسین ساز به شمار می روند. محصولات زراعی به ویژه غلات، معمولاً با ورود به انبار به کندی های اسپرثیلوس و پنی سلنیوم آلوده می شوند. کندی های نهفته که از خاک، بقایای مرده گیاهان و بقایای ناشی از برداشت مکانیکی منشأ می گیرند، معمولاً سطح بذرها را آلوده می کنند. گونه

های آسپرژیلوس در همه جا پراکنده اند و روی بسیاری از محصولات کشاورزی، از جمله غلات انبار شده به رشد و نمو می پردازند. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

همانطور که قبلاً اشاره شد در حالت کلی برای تولید این سموم نیاز به رطوبت بالاتر از ۱۵ درصد و درجه حرارت حداقل ۲۵ درجه می باشد (Quine et al., 1994). در تعدادی از منابع عنوان شده است که برای تشکیل آفاتوکسین ها، طیف درجه حرارت مناسب حدود ۲۵ الی ۳۲ درجه سلسیوس (۷۸ تا ۹۰ درجه فارینهایت) می باشد. اگرچه درجه حرارت های کمتر از ۵۵ درجه فارینهایت برای مدت دو روز نیز می تواند باعث تولید آفاتوکسین شود. آفاتوکسین در غلات در درجه رطوبت حدود ۱۲ الی ۲۸ درصد تولید می شود. (Gray, 1996) با توجه به این مهم لازم است که شرایط انبارهای نگهداری مواد غذایی مصرفی در تولید خوراک ماهیان طوری تحت کنترل حرارتی و رطوبتی باشد، که در شرایط فوق الذکر قرار نگیرد.

فرایندهای مختلفی که در حین تهیه خوراک ماهیان به صورت پلت انجام می شود، بر اساس مطالعات انجام شده که قبلاً هم به آن ها اشاره شد، در صورتیکه با کنترل کیفی محصول در مراحل خطر ساز از لحاظ آلودگی همراه باشد، می تواند راه حل مناسبی برای کاهش مقادیر آفاتوکسین توتال در محصول باشد و اینجاست که اهمیت استفاده از سیستم نظارتی HACCP و تعیین نقاط کنترل بحرانی در خط تولید این محصول بیش از پیش احساس می شود. اعمال روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی که در فصل اول کتاب به طور کامل به آن ها اشاره شده است، بسته به شرایط تولید و اقتصادی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این بین استفاده از روش های فیزیکی نظیر جداسازی اجزای آسیب دیده از طرق مختلف نظیر شناورسازی، فیلتراسیون و استفاده از صافی مناسب، آسیاب نمودن خشک. مرطوب و گاه روش هایی نظیر پرتوافکنی و استفاده از نور خورشید، به عنوان ارزان ترین روش ها در کاهش بار آلودگی مورد استقبال قرار می گیرد. همچنین استفاده از افزودنی هایی همچون ترکیبات آنتی میکروبیال جهت ممانعت از رشد عوامل قارچی در انبارها و در ترکیب خوراک تولیدی، استفاده از مواد جاذب مایکوتوکسین نظیر MycosorbTM با ویژگی های مطلوب مواد شیمیایی افزودنی که قبلاً به آن ها اشاره شد، می تواند تأثیر گذار باشد. هم اکنون استفاده از این افزودنی ها به عنوان یک راهکار مناسب که سلامت مصرف کننده را نیز در برمی گیرد.

در آخر ذکر مجدد این نکته لازم است که خطرات ناشی از آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین ها، چالش بزرگی را فراروی دولت ها و آژانس های بین المللی مسؤول در قبال کنترل این مواد قرار می دهد. وجود نقاط ضعف در مبانی اطلاعاتی ارزیابی ریسک و فقدان هماهنگی در تصمیمات مدیریت ریسک که موجب عدم دستیابی به اجماع بین المللی در زمینه حدود آستانه آفاتوکسین ها گشته اند، احتمالاً در آینده نیز مشکلات بزرگی را در رابطه با تجارت محصولات آلوده به سایر مایکوتوکسین ها فراروی ما قرار دهند. بدین جهت اتخاذ یک رویکرد علمی و هماهنگ در زمینه تحلیل ریسک توسط دولت ها و به منظور مقابله با مشکلات ناشی از حضور مایکوتوکسین ها در مواد غذایی، ضروری است. در این رابطه، کمیسیون کدکس (Codex Alimentarius Commission¹) باید دیدگاه های رقابتی مدیریت ریسک را تعدیل نموده و بدین ترتیب نه تنها سلامت مصرف کنندگان را تضمین نماید، بلکه مانع از ایجاد موانع غیرتعرفه ای تضمین نشده در تجارت مواد غذایی گردد. دستیابی به این هدف میسر نخواهد شد مگر تحت حمایت تشکیلات تقویت شده JECFA² (کمیته مشترک متخصصان افزودنی های خوراکی و آلاینده ها)، اطلاعات پیشرفته در زمینه توصیف ویژگی خطر و سنجش در معرض خطر قرارگیری. (کمیته JECFA در سال ۱۹۵۶ و با هدف گردآوری و ارزیابی اطلاعات علمی در زمینه افزودنی های غذایی و ارایه توصیه های ایمنی در مورد مصرف آن ها آغاز به کار کرد و در سال ۱۹۷۲ سنجش آلاینده ها را در مواد غذایی را هم در بر گرفت که البته هنوز ارزیابی آنها در خصوص مایکوتوکسین ها کامل نمی باشد). (علوی، ۱۳۸۳)



شکل ۳-۴ : آنالیز ارزیابی ریسک و برنامه امنیت غذایی برای مواد سمی به طور طبیعی ایجاد شده در محصولات کشاورزی و باغی و دامی (کوشال و دیپاک ، ۱۳۸۳)

در این میان سازمان بهداشت جهانی (WHO)، همچنان به انجام رسالت خود مبنی بر تشخیص نقش احتمالی میکروتوکسین ها در ایجاد بیماری های مزمن همچون تصلب شرایین که تا کنون دلایل سبب شناختی آن دقیقاً مشخص نشده اند، متعهد مانده است. علاوه بر این، سازمان مذکور همچنان به

توسعه و بهبود برنامه جهانی نظارت بر آلودگی مواد غذایی به میکوتوکسین ها، بر اساس موازین مدون³ GEMS/Food و با بهره گیری از همیاری کشورهای عضو WHO ادامه خواهد داد.

نظر به ریسک بالقوه ناشی از میکوتوکسین ها و با توجه به توصیه JECFA، ادامه تلاش جهت ابداع روش های پیشگیری، کاهش یا نابودسازی کامل میکوتوکسین ها در مواد غذایی امری لازم و منطقی به شمار می آید. در این راستا، تقویت تلاش های تحقیقاتی جهانی به ویژه در کشورهای در حال توسعه، از ضرورت و اهمیت به سزایی برخوردار است. انتشار اطلاعات و تأسیس مراکز ارتباطی همچون مراکز همیاری سازمان بهداشت جهانی در زمینه آلودگی مواد غذایی (CCFAC⁴) می تواند انجام این امر مهم را تسهیل نماید و همچنین منابع مالی و نیروی انسانی لازم جهت تحقیق در زمینه میکوتوکسین ها و مشکلات ناشی از آن ها باید تقویت شوند تا بدین ترتیب موجبات تسریع پیشرفت های جدید و نویدبخش را فراهم نماید. در این راستا، انتقال فن آوری پیشرفته از کشورهای توسعه یافته به کشورهای در حال توسعه، امری ضروری است. (کوشال و دیپاک، ۱۳۸۳)

امید آنکه تحقیق حاضر نیز بتواند گامی هر چند کوچک در راستای تحقق اهداف پیش روی جامعه جهانی در خصوص این مشکل عمده سلامت نسل بشر باشد. هرگز نباید فراموش کرد که :

« سلامت یک ملت، زیربنای اصلی سعادت و صلابت آن ملت را تشکیل می دهد. » (بنیامین دیزارلی)

کیوان ابراهیمی محمدی

دانشجوی دوره دکترای تخصصی رشته بهداشت مواد غذایی

دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی

دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات تهران

۱- کمیسیون کدکس یک نهاد بین دولی است که در سال ۱۹۶۳ توسط سازمان بهداشت جهانی و سازمان خواربار و کشاورزی و با هدف تأمین سلامت مصرف کنندگان و کسب اطمینان از رعایت انصاف در تجارت مواد غذایی، پایه ریزی شد. کدکس که اکنون بیش از ۱۵۰ کشور جهان در آن عضویت دارند، مجموعه قابل توجهی از استانداردهای اختیاری، راهنماها و سایر توصیه ها را تدوین و منتشر نموده است تا از این طریق تجارت بین المللی مواد غذایی را تسهیل نماید.

۲- JECFA : کمیته JECFA در سال ۱۹۵۶ و با هدف گردآوری و ارزیابی اطلاعات علمی در زمینه افزودنی های غذایی و ارایه توصیه های ایمنی در مورد مصرف آن ها آغاز به کار کرد و در سال ۱۹۷۲ سنجش آلاینده ها را در مواد غذایی را هم در بر گرفت که البته هنوز ارزیابی آنها در خصوص میکوتوکسین ها کامل نمی باشد.

۳- GEMS/Food : Global Environmental Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment
Program یا سیستم جهانی نظارت زیست محیطی / برنامه ارزیابی و نظارت بر آلودگی مواد غذایی که هدف آن که در حال حاضر تقریباً در ۷۰ کشور جهان دارای مؤسسات و شعب نمایندگی است، آگاه نمودن دولت ها، کمیسیون کدکس و سایر مؤسسات مربوطه و نیز مردم از سطوح و روند عملکرد آلاینده ها در مواد غذایی، سهمشان در میزان قرار گرفتن انسان در معرض این مواد و اهمیت آن ها از نظر بهداشت عمومی و تجارت است که موضوع آفاتوکسین ها هم در برنامه کاری آن قرار دارد.

۴- Codex Committee on Food Additives and Contaminants : CCFAC یا کمیته کدکس ناظر بر افزودنی های خوراکی و آلاینده های غذایی

فهرست منابع :

الف- منابع فارسی :

- ۱- اسمیت- برادفورد (۱۹۹۶)، طب داخلی دام های بزرگ، جلد چهارم، (ترجمة سيد محمد مرجانمهر، سيد احمد فاطمي، مرتضي گرجي دوز)، انتشارات نوربخش، صفحات ۳۲۵ الي ۳۳۰.
- ۲- تقی پور بازرگانی، تقی، پورجعفر، مهرداد، پناهنده، محمدجواد و ساسانی، فرهنگ (۱۳۷۵)، گزارش موارد هپاتوانسفالوپاتی ناشی از مسمومیت با آفلاتوکسین در یکی از گاوداری های اطراف شیراز، مجله پژوهش و سازندگی، زمستان ۷۵، صفحات ۱۴ الی ۲۳.
- ۳- توتونچیان، محسن (۱۳۸۱)، بررسی مقادیر آفلاتوکسین در جیره های دام و طیور آذربایجان و نگرشی بر مایکوتوکسیکوزیس در دامپزشکی، پایان نامه دکتری عمومی شماره ۷۳۴، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، صفحات ۴۱ الی ۵۱ و ۱۳۵ الی ۱۴۲.
- ۴- جیمز، ام جی (۱۳۸۲) میکروبیولوژی غذایی مدرن، جلد دوم، ترجمه مرتضوی، سید علی، معتمدزادگان، علی، اعلی، مهران و گوهری اردبیلی، اشرف)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۵۷۱ الی ۵۹۲.
- ۵- رضویلر، ودود (۱۳۸۱)، میکروب های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۴۶ الی ۵۲ و ۱۹۷ الی ۲۱۷.
- ۶- رکنی، نوردهر (۱۳۸۳)، اصول بهداشت مواد غذایی، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۲۹ الی ۳۳.
- ۷- سیمای شیلات استان آذربایجان غربی (۱۳۸۳)، گردآوری شده توسط روابط عمومی اداره کل شیلات استان آذربایجان غربی، صفحات ۱ الی ۷.
- ۸- عباس طلائی، محمدرضا (۱۳۷۶)، بررسی راه های مختلف تشخیص و اندازه گیری آفلاتوکسین ها در مواد غذایی، پروژه کارشناسی شماره ۲۴۳، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، صفحات ۸ الی ۲۴.
- ۹- فریزیر، ویلیام و وستهوف، دنیس (۱۳۸۴) میکروبیولوژی مواد غذایی، چاپ چهارم (ترجمة مرتضوی، سید علی، کاشانی نژاد، مهدی و ضیائالحق، سیدحمید رضا)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۳۳ ال ۵۴.
- ۱۰- کریم، گیتی (۱۳۸۲)، آزمون های میکروبی مواد غذایی، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۲۵۳ الی ۲۸۹.
- ۱۱- کوشال کی، سینها و دیپاک بهاتناگر (۱۳۸۳) مایکوتوکسین ها در کشاورزی و امنیت غذایی، جلد اول، (ترجمة علوی، سید احمد)، انتشارات نشر علوم کشاورزی کاربرد، صفحات ۱ الی ۲۰، ۳۰۵ الی ۳۸۶ و ۲۲۳ الی ۲۸۷.

۱۲- کوشال کی، سینها و دیپاک بهاتناگر (۱۳۸۳) مایکوتوکسین ها در کشاورزی و امنیت غذایی، جلد دوم، (ترجمة علوی، سید احمد)، انتشارات نشر علوم کشاورزی کاربرد، صفحات ۶۴۴ الی ۶۷۳، ۶۸۳ الی ۷۲۲ و ۸۱۰ الی ۸۳۱.

۱۳- مرتضوی، احمد و طباطبایی، فریده (۱۳۷۰)، توکسین های قارچی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۵ الی ۱۶، ۳۱ الی ۱۰۸ و ۱۱۵ الی ۱۵۶.

۱۴- مرتضوی، سید علی، خانی پور، الهام و حسینی پرور، سید هاشم (۱۳۸۴) اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۲۲۴ الی ۲۲۹.

۱۵- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۶۹)، روش اندازه گیری میزان آفلاتوکسین های گروه B و G در مواد غذایی، شماره ۱-۲۷۱۱.

۱۶- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۷۲)، روش جستجو و شمارش قارچ ها (کپک ها و مخمرها) به روش شمارش پرگنه در ۲۵ درجه سلسیوس، شماره ۱۰-۹۹۷.

۱۵- سایت اینترنتی ویکی پدیا www.wikipedia.com

References:

منابع انگلیسی :

- 16- Abdelhamid, A.M., Khalil, F.F. and Ragab, M.A.(1998). Problem of mycotoxins in fish production. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*. 1(1): 63-71.
- 17- Baudurent Pascal (1990). A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion Island. *Mycopathologia Journal*. 109(3): 157-169.
- 18- Bennett G.A.and Andeson R.A.(1978). Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. *J Agric food Chem*. 26:1055.
- 19- Benkerroum, S. and Tantaoui-Elaraki, A.(2001). Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. *Revue de Medicine Veterinaire*. 152(4): 335-342.
- 20- Bhatti, B.M., Tanzeela, T. and Rozina, S. (2001). Estimation of aflatoxin B₁ in feed ingredients and compound poultry feeds. *Pakistan Veterinary Journal*. 21(2): 57-60.
- 21-Bintvihok, A., Ponpornpisiti, A., Tangtrongpiros, J., Panichkriangkrai, W., Rattanapanee, R., Doi, K. and Kumagi, S.(2003). Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *Journal of food Protection*, 66(5): 882-885.
- 22- Brekke,O.L., Sinnhuber, R.O. Pepliski, A.J., Wales, J.H., Putnam, G.B., Lee, D.J. and Ciegler A.(1977). Aflatoxin in corn: ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout . *Applied and Environmental Microbiology*. 34(1):34-37.
- 23- Choudhary A.K. (1992). Influence of microbial co-inhabitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. *Lett Appl Microbial*. 14:143.
- 24- Cole R.J.(1989). Technology of aflatoxin decontamination . In: Natori S., Hashimoto K., Ueno Y.,eds. *Mycotoxins and Phycotoxins* `88. Amsterdam; Elsevier Scientific. p: 177.
- 25- Davis N.D., Currier C.G. and Diener U.L.(1986). Aflatoxin contamination of corn hybrids in Alabama .*Cereal Chem*. 63: 467.

- 26- Dutta T.K. and Das P. (2001). Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B₁ from feed in India. *Mycopathologia Journal*. Springer Netherland. 151(1): 29-33.
- 27- Eqmond, H.P. Van; Eqmond, H.P.; Nutori, S.; Hashimoto, K and Ueno, Y. (1989). Current situation on regulation for mycotoxins and phytotoxins, *Veterinary Medicine Journal*, 88(6) : 249-256.
- 28- Galvano, F and Andrea, Piva. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Production*, 64(1) : 121-128.
- 29- Gary, D.O. (1999). Mycotoxins contemporary issues of feed animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*. 16(3) : 511-531.
30. Gary, D.O. (1996). *Toxicology*, 1th Edition, Williams and Wilkins, London. PP. : 409-436.
- 31- Guerrero De Leon, C.R., Garcia, G and Pagosa, C.M. (1992) *Fundamental Statistics for college students*. Sinag-tala publishers greenhills p.o. box 536 Manila, Philippines. PP. : 135-139
- 32- Hendricks, J.D & Bailey, G.S. (1998). Adventitious Toxin, In: I.E. Halver (Editor), *Fish Nutrition* (Second edition), Academic Press Inc, New York, U.S.A.: 605-651.
- 33- Hamed K. Abbas, W. T. Sheir, B.W. Horn and M.A. Weaver (2004). Cultural method for aflatoxin detection. *Toxin Reviews, Informa healthcare Journal*. 23(2&3): 295-315.
- 34- Horn A.W. and Wichlow D.T. (1983). Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Can J Microbial*. 29: 1087.
- 35- Howard, J. L. and Smith, R.A. (1999). *Current veterinary therapy 4, food animal practice; Section 6, Physical and Chemical Disease*, W.B. Sanders Company, London. PP. : 254-264.
- 36- Humpherys, D. J. (1988). *Veterinary toxicology*, 3th Edn. Baillere Tindall, London. PP. : 283- 313.

- 37- Khan, M.J., Renata, U.C., Christine, I. and Bohm, J.(2001). Occurrence of aflatoxins in some common concentrate feeds in bangladesh. Journal of Bangladesh Veterinarian. 18(2): 130-135.
- 38- Lopez, C.; Ramos, L.; Romadan, S.& Bulasio,L. (2003). Presence of aflatoxin M1 for human consumption in Argentina. Food control, 14(1) : 31-34.
- 39- Lopez, C.; Ramos, L.; Romadan, S.& Bulasio,L.& Perez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated.International,Journal of Food Microbiology,64(5): 211-215.
- 40-Lopez, R.Garcia;Park,D.L.&Phillips, T.D.(2001). Integrated mycotoxin manegement system. Agric Food Chem Journal, 46(9) :599-605.
- 41- Magnoli C.(1998). Enumeration and identification of *Asprgillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. Mycopathologia Journal. 142(1):27-32.
- 42- Micheal Z.Zheng, John L. Richard and Johann Binder (2006). A review of rapid methods for the nanlysis of mycotoxins. Mycopathologia Journal. 161(5): 125-145.
- 43- Miguel, A.M.R. and Guillermo, S.F.(1986). Aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from Spanish Poultry feeds. Mycopathologia Journal. 95(3): 129-132.
- 44- Nicholas W. Turner, Sreenath Subrahmanyam and Sergey A. Piletsky (2009). Analytical method for determination of mycotoxins. Analytica Chimica Acta Journal.632 (2):168-180.
- 45-Nguyen Anh Tuan, Grizzle, J.M, Manning, B.B. and Rottinghaus,G.E.(2002). Growth and hepatic lesion of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. Aquaculture Journal. 212(1/4):311-319.
- 46- Ottinger, C.A. and Kaattari, S.L.(1998). Sensitivity of rainbow trout leucocytes to aflatoxin B₁. Fish& Shellfish Immunology Journal.8(7): 515-530.
- 47- Phillips T.D., Clement B.A. and Park D.L.(1994). Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In: Eaton D.L., Groopman J.D. eds. The Toxicology of aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. San Diego; Academic Press. P: 383.

- 48- Piva, G., Galvano, FP.F., Pietri, RD.A. and Piva, RD.(1995). Detoxification methods of aflatoxin, a review. *Nutrition Research J.* 15(5): 767-776.
- 49- Quine, P.J.; Carter, M.E.; Morkey, B.K.& Carter, G.R. (1994). *Clinical veterinary microbiology*, 4th Edn. W.B.Sanders Company, London ,PP. : 421-436.
- 50- Radostists, Otto.M.; Gay, Clive.C.; Blood, Douglas.C. & Hinchcliff, Kenneth.W.(2000). *Veterinary Medicine, a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats & horses*, 9th Edn. W. B. Sanders Company, London. PP.: 1685-1701.
- 51- Ramashkumar, B; Rajasundaram, R.C. & Subramanian, A.C.(1988). Incidence of mycotoxic abortion in a dairy heard. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 9(2) : 122- 141.
- 52- Rice L.G.and Rose F.P.(1994). Method for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta.*J Food Prot.* 57:536.
- 53- Rob, R; Reisnerova, H; Yamba, C.Y.& Pavlistra,J.(1993). Demonestation of aflatoxin B1 and ochratoxin A in feed and testis of breeding bulls. *Journal of the Veterinary Research*, 43(8) : 302-304.
- 54- Royes, Juli-Anne B. & Yanong, Roy P.E.(2002). *Molds in fish feeds and aflatoxicosis* . From Florida University web site.([www.florida university.com](http://www.florida.university.com))
- 55- Ruston I.Y.S.(1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry Journal.* 59(1) 57-67.
- 56- Saad, N. (2005). Aflatoxin : occurrence and health risks.From Poisonous plants international database. Cornell university web site.(www.cornell university.com)
- 57- Sahoo, P.K. and Mukherjee,S.C.(2001). Immunosuppressive effects of aflatoxin B₁ in India major carp (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology& Infectious Diseases.* 24(3):143-149.
- 58-Scott P.M.(1984). Effects of food processing on mycotoxins. *J Food Prot.* 47(6): 489.

59- Wood G.M., Cooper S.J. and Chaoman W.B.(1982). Problems associated with laboratory simulation of effects of food processing on mycotoxins. Proceeding of V Int IUPAC Symp Mycotoxins, Vienna, Austria, p:142.

60- FAO web site: www.fao.org , aflatoxins and aflatoxicosis.(Received data : 2005.05.25)

ABSTRACT:

A survey on prevalence rate of Aflatoxigenic species of *Aspergillus* and residues of aflatoxins by ELISA method in cold-water cultural fish (Rainbow Trout) feeds in Tehran and West Azarbayjan provinces - Iran.

Aflatoxins are one kind of fungal toxins produced by species of toxigenic *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. parasiticus*), and in other words they are secondary metabolites which are considered as one of the threatening factors of food consumer's health.

In this research 96 samples of cold-water cultural fish feed, Rainbow Trout, during the seasons of spring and summer of 2007 (every fifteenth of the month) were randomized (by simple and stratified randoms) to determine:

1. The prevalence rate of aflatoxigenic species of *Aspergillus* in stored feed of cold-water cultural fish in West Azarbayjan cultural fish farms in both seasons (spring and summer);
2. The residues of total aflatoxin in stored feed of fish in cultural fish farms of West Azarbayjan in both seasons by ELISA method; and
3. The residues of that toxin in feed produced in aquatic feed factories in Tehran and West Azarbyjan provinces with the same method.

In order to study prevalence rate of toxigenic species of *Aspergillus*, pour-plate culture method by general medium such as Malt Extract Agar (M.E.A.) and Sabouraud-Dextrose Agar (S.D.A.) and by standard No.997 of Iranian Standard Institute, were used. The produced colonies were examined microscopically. To determine the aflatoxins residues, ELISA method using Agra-Quant kit of Romer lab.company, were applied.

The results of this survey indicated that only 8.3% of the samples were infected by *A. flavus* . *A. parasiticus* was not observed. There were no significant differences between the prevalence rate of AFT and seasons/months, either ($P < 0.05$).

Evaluating mean of aflatoxin rate showed that the rates of this variable are lower than the tolerance levels designated by the joint FAO/WHO expert committee. (The mean of AFT in all data was lower than 11 ppb). Furthermore, mean of total AFT residues rates of stored feed of various cultural center of West Azarbayjan and Tehran factories were comparable in spring and summer, and no significant differences were observed ($P < 0.05$). But there were significant differences between the total aflatoxin rates in the feed of W. Azarbayjan factory and spring and summer ($P < 0.05$), and AFT residues in spring (8.6 ppb) were higher than summer (6.1 ppb).

Prevalence rates of AFT in Tehran feed factories (9.2 ppb) are higher than W. Azarbayjan (7.4 ppb). In other words, location was considered as a decisive factor in total AFT rates of samples.

Moreover the results indicated that there was significant difference between total aflatoxin rates of feed and cultural centers ($P < 0.05$). The mean of AFT rates in imbankment dam cultural fish farms (6.75 ppb) and multi-functions cultural fish farms (6.25 ppb) was higher than individual cultural pond (4.67 ppb).

In conclusion, the finally results of this survey indicated that the lower rates of *Aspergillus* is not effective on the presence of total aflatoxin rates in trout feed. Due to low levels of aflatoxin rates (lower than 20 ppb), the produced feed of cold-cultural fishes, Rainbow Trout, in Tehran and West Azarbayjan provinces, in spring and summer of 2007, were safe and healthy both for fish and their consumers.

Keiwan Ebrahimi Mohammadi



Islamic Azad University
Science and research branch- Tehran

Ph.D thesis in Veterinary- Food hygiene

Subject:

A survey on prevalence rate of Aflatoxigenic species of *Aspergillus* and residues of Aflatoxins by ELISA method in cold-water cultural fish (Rainbow Trout) feeds in Tehran and West Azarbayjan provinces - Iran.

Supervisor:

Prof. Dr. Vadood Razavilar

Advisor:

Dr. Abbasali Motallebi

Author:

Keiwan Ebrahimi Mohammadi

May 2009

In the Name Of God